

Untersuchungen zur Eignung von Triplehelix-bildenden und  
bifunktionellen Oligonukleotiden als neue Werkzeuge zur  
*in situ*-Modifizierung von Pflanzengenomen

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Marco Swenty  
aus Potsdam

1. Referent: Prof. Dr. R. Hehl

2. Referent: Prof. Dr. S. Dübel

eingereicht am: 18.08.2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 12.12.2005

2006

(Druckjahr)





# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>
1.1	Neue Anforderungen an die Pflanzenzüchtung
1.2	Homologe Rekombination
1.3	Entdeckung von Triplehelix-Strukturen
1.4	Struktur der Triplehelix
1.5	Zielsequenzen für Triplehelix-bildende Oligonukleotide
1.6	Aufbau Triplehelix-bildender Oligonukleotide
1.7	Aufnahme von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden in die Zelle und Transport in den Zellkern
1.8	Modifizierungen von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden
1.9	Anwendungen
1.9.1	Nutzung von <i>Hoogsteen</i> -Bindungen für die sequenzspezifische Anlagerung modifizierender Oligonukleotide - Triplehelix-bildende Oligonukleotide
1.9.2	Nutzung von <i>Watson-Crick</i> -Bindungen für die sequenzspezifische Anlagerung modifizierender Oligonukleotide - Chimäre Oligonukleotide
1.9.3	Kombinierte Nutzung von <i>Hoogsteen</i> -Bindungen und <i>Watson-Crick</i> -Bindungen für die sequenzspezifische Anlagerung modifizierender Oligonukleotide - Bifunktionelle Oligonukleotide
1.10	Modellpflanzen
1.11	Strategien zur Durchführung des Projektes
1.11.1	Modellsysteme auf der Basis des Gens für das <i>green fluorescent protein</i> (gfp)
1.11.2	Modellsystem auf der Basis des Bialaphos-Resistenzgens (bar)
<b>2</b>	<b>Material</b>
2.1	Geräte
2.2	Chemikalien
2.3	Enzyme
2.4	Spezielle Chemikalien und kommerzielle Komplettsysteme
2.5	Verbrauchsmaterialien
2.6	DNA
2.6.1	Zielgensequenz
2.6.2	Oligonukleotide
2.6.3	Plasmide
2.7	Bakterienstämme
2.8	Medien
2.8.1	Medien für die Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>
2.8.2	Medien für die Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
2.8.3	Medien für die Kultivierung von <i>Solanum tuberosum</i>
2.9	Pflanzenmaterial

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	27
<b>3.1</b>	<b>Kulturverfahren und Stammhaltung von <i>E. coli</i></b>	27
3.1.1	Anzucht von Bakterienkulturen	27
3.1.2	Kompetente <i>E. coli</i> -Kulturen	27
3.1.3	Stammhaltung von Bakterienkulturen	27
<b>3.2</b>	<b>Kultivierung und Transformation von <i>Solanum tuberosum</i></b>	28
3.2.1	Sterilkultur von <i>Solanum tuberosum</i>	28
3.2.2	Erdkultur von <i>Solanum tuberosum</i>	28
3.2.3	Protoplastierung	28
3.2.4	Elektroporation von Protoplasten	29
3.2.5	Protoplastenkultur in Alginatkugeln	29
3.2.6	Befreiung von Mikrokalli aus Alginatkugeln und Regeneration	30
<b>3.3</b>	<b>Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>Solanum tuberosum</i></b>	30
3.3.1	Anzucht der Agrobakterien	30
3.3.2	Transformation der Explantate	30
3.3.3	Regeneration transgener Sprosse	31
<b>3.4</b>	<b>Kultivierung und Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	31
3.4.1	Kultivierung	31
3.4.2	Transformation	32
3.4.3	Selektion positiver Transformanden	32
<b>3.5</b>	<b>Arbeiten mit DNA</b>	33
3.5.1	Plasmidpräparationen aus <i>E. coli</i>	33
3.5.2	Plasmidpräparationen aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
3.5.3	Reinigung von DNA-Lösungen	34
3.5.4	Elektrophorese von DNA im Agarosegel	35
3.5.5	Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	36
3.5.6	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	36
3.5.7	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	36
3.5.8	Dephosphorylierung von einzelsträngigen DNA-Enden	36
3.5.9	Ligation	36
3.5.10	Elektroporation von <i>E. coli</i>	36
<b>3.6</b>	<b>Gewinnung von Nukleinsäuren aus pflanzlichen Geweben</b>	37
3.6.1	Isolierung von DNA aus pflanzlichen Geweben	37
3.6.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben	37
<b>3.7</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	38
<b>3.8</b>	<b>Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)</b>	38
<b>3.9</b>	<b>Triplehelix-spezifische Methoden</b>	39
3.9.1	Design von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden	39
3.9.2	Hybridisierung von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden und Ziel-DNA <i>in vitro</i>	40
3.9.3	Bestrahlung mit UVA	40
<b>3.10</b>	<b>Triplehelix-Nachweise</b>	40
3.10.1	Gelretardation	40
3.10.2	Triplehelix-Nachweis durch magnetische Separation	41
<b>3.11</b>	<b>Nachweis fluoreszenzmarkierter Triplehelix-bildender Oligonukleotide in Zellkernen</b>	42
<b>3.12</b>	<b>Western-Analyse von pflanzlichen Proteinen</b>	43
3.12.1	Proteinextraktion aus pflanzlichem Gewebe	43
3.12.2	SDS-PAGE	43
3.12.3	Immunoblot Analyse	43

3.12.4	Immunologischer Nachweis	44
<b>3.13</b>	<b>PAT-ELISA - Test</b>	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	45
<b>4.1</b>	<b>Das Modellgen</b>	45
<b>4.2</b>	<b>Triplehelix-Bildung <i>in vitro</i> an kurzer linearer Ziel-DNA</b>	47
4.2.1	Triplehelix-bildende Oligonukleotide für die <i>in vitro</i> -Hybridisierung	47
4.2.2	Nachweis der Triplehelix-Bildung durch Gelretardation	49
<b>4.3</b>	<b>Das Modellgensystem aus gfp-Gen und 550 bp-gbssI-Insert</b>	52
4.3.1	Erstellen von gfp-Modellgenen mit 550 bp-gbssI-Insert	52
4.3.1.1	Fusionsgene mit mgfp5-ER	52
4.3.1.2	Fusionsgene mit pCK S65C gfp	53
4.3.2	Erstellen transgener <i>Arabidopsis</i> -Linien mit 550 bp-gfp-Modellgen	53
4.3.3	Erstellen transgener Kartoffel-Linien mit 550 bp-gfp-Modellgen	54
<b>4.4</b>	<b>Das Modellgensystem aus gfp-Gen und 39 bp-gbssI-Insert</b>	55
4.4.1	Erstellen von gfp-Modellgenen mit 39 bp-gbssI-Insert	55
4.4.1.1	Fusionsgen mit mgfp5-ER	55
4.4.1.2	Fusionsgen mit pGJ304	56
4.4.2	Transiente Testung der 39 bp-gfp-Modellgene in Protoplasten	56
4.4.3	Erstellen transgener Pflanzen mit 39 bp-gfp-Modellgen	57
4.4.4	Transkriptionsanalyse transgener <i>Arabidopsis</i> -Linien mittels RT-PCR	57
4.4.5	Western-Analyse transgener <i>Arabidopsis</i> -Linien	58
4.4.6	Transkriptionsanalyse transgener Kartoffel-Linien mittels RT-PCR	59
4.4.7	Western Analyse transgener Kartoffel-Linien	60
4.4.8	Untersuchung der Triplehelix-Bildung <i>in vitro</i> an isolierter genomischer DNA	60
4.4.8.1	Triplehelix-bildende Oligonukleotide für die <i>in vitro</i> -Hybridisierung	61
4.4.8.2	Nachweis der Triplehelix-Bildung durch magnetische Separation	62
4.4.9	Bifunktionelle Oligonukleotide für <i>in situ</i> – Versuche mit dem gfp-Modellgen	63
4.4.10	Transport von fluoreszenzmarkierten bifunktionellen Oligonukleotiden in den Zellkern	65
4.4.11	Modifizierungsversuche mit bifunktionellen Oligonukleotiden	68
<b>4.5</b>	<b>Das Modellgensystem aus bar-Gen und 39 bp-gbssI-Insert</b>	71
4.5.1	Erstellen von bar-Modellgenen mit 39 bp-gbssI-Insert	71
4.5.2	Erstellen transgener Pflanzen mit dem bar-Modellgen	71
4.5.3	Transkriptionsanalyse transgener Kartoffel-Linien mittels RT-PCR	72
4.5.4	Bifunktionelle Oligonukleotide für <i>in situ</i> – Versuche mit dem bar-Modellgen	72
4.5.5	Modifizierungsversuche mit bifunktionellen Oligonukleotiden	73
4.5.6	Expressionsanalyse transgener Kartoffel-Linien mittels BAR-ELISA	74
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	75
<b>5.1</b>	<b>Bindungsfähigkeit von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden</b>	75
5.1.1	Studien an linearer Ziel-DNA mit Polypurinbereichen	75
5.1.1.1	Der Einfluss des pH-Wertes	77

5.1.1.2	Der Einfluss der Hybridisierungs-Temperatur	77
5.1.1.3	Der Einfluss der Hybridisierungs-Dauer	77
5.1.2	Studien an genomischer Ziel-DNA mit Polypurinbereichen	78
<b>5.2</b>	<b>Transport von Oligonukleotiden in den Zellkern</b>	81
<b>5.3</b>	<b>Arbeiten mit transgenen Modellgen-Pflanzen</b>	82
5.3.1	Bewertung des gfp-Modellgensystems	82
5.3.1.1	Der Integrationsort des Modellgens	84
5.3.1.2	Die Häufigkeit der homologen Rekombination	84
5.3.2	Mögliche Ursachen für die unerwartete PPT-Resistenz transgener TG-Linien mit dem bar-Modellgen	85
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	87
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	89
<b>7.1</b>	<b>Sequenzen von gfp-Modellgenen mit 550bp-Insert</b>	89
7.1.1	KG gfp-ER in pLH9000	89
7.1.2	TG gfp-ER in pLH9000	90
7.1.3	KG pCK gfp S65C	91
<b>7.2</b>	<b>Sequenzen von gfp-Modellgenen mit 39bp-Insert</b>	92
7.2.1	KG gfp-ER 39 bp in pLH9000	92
7.2.2	TG gfp-ER 39 bp in pLH9000	92
7.2.3	KG pGJ304 39 bp in pLH9000	93
7.2.4	TG pGJ304 39 bp in pLH9000	93
<b>7.3</b>	<b>Sequenzen von bar-Modellgenen</b>	94
7.3.1	Kartoffel-Linie KG5	94
7.3.2	Kartoffel-Linie KG33	94
7.3.3	Kartoffel-Linie TG26	95
7.3.4	Kartoffel-Linie TG41	95
<b>7.4</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	96
<b>7.5</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	98
<b>7.6</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	99
<b>7.7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	100



# 1 Einleitung

## 1.1 Neue Anforderungen an die Pflanzenzüchtung

Die Pflanzenzüchtung der Gegenwart steht vor großen Herausforderungen. Die Ernährung einer wachsenden Weltbevölkerung, trotz knapper werdender geeigneter Anbauflächen, kennzeichnet die Hauptproblematik der aktuellen Entwicklung. Der sich gegenwärtig abzeichnende Klimawandel mit seinen möglichen negativen Folgen für die Landwirtschaft erschwert diese Aufgabe zusätzlich. Zudem werden durch die Verknappung fossiler Rohstoffe, bei gleichzeitig steigendem Bedarf, neue Züchtungsziele für Nutzpflanzen definiert. Die klassische Pflanzenzüchtung stößt bei der Bearbeitung dieser Vielzahl geforderter neuer Eigenschaften an ihre Grenzen.

Einen Ausweg stellt die Einbeziehung gentechnischer Methoden in die Pflanzenzüchtung dar. Wichtige Eigenschaften aus anderen Organismen können so in landwirtschaftlich bedeutsame Kulturarten übertragen werden.

Eine Alternative zum Übertragen von Genen ist die *in situ*-Modifizierung vorhandener pflanzlicher Gensequenzen. Damit werden Probleme wie *silencing* des Fremdgens oder Positionseffekte umgangen.

## 1.2 Homologe Rekombination

Die gezielte Veränderung von chromosomalen Genen, als *gene targeting* bezeichnet, macht sich den Vorgang der homologen Rekombination zunutze. Dabei werden annähernd identische (homologe) genomische Sequenzen rekombiniert. In meiotischen Zellen dient die homologe Rekombination der Neukombination der genetischen Information der Eltern. In somatischen Zellen werden durch diese Vorgänge vor allem Mutationen und DNA-Brüche repariert. Durch homologe Rekombination erfolgt die Reparatur dieser Schäden konservativ, d.h. ohne Veränderung der ursprünglichen Nukleotidsequenz. In somatischen Zellen von Pflanzen überwiegt jedoch die illegitime Rekombination. Unabhängig von Sequenzhomologien werden bei diesen Vorgängen DNA-Abschnitte miteinander verknüpft und dadurch die ursprüngliche Basenabfolge verändert. Homologe und illegitime Rekombinationen wurden mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit bei vielen Organismen beobachtet (Puchta, 2000).

In pflanzlichen Zellen treten homologe Rekombinationen sehr selten auf. Die Häufigkeit liegt unabhängig von der Pflanzenart im Bereich von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$ , also einer homologen Rekombination auf 10.000 – 100.000 illegitime Rekombinationen. In tierischen Systemen ist die Rate homologer Rekombinationen ähnlich niedrig wie in Pflanzen (Vasquez *et al.*, 2001). Allerdings können bestimmte Zelltypen, wie embryonale Stammzellen, wesentlich höhere homologe Rekombinationsraten im Prozentbereich aufweisen (Jasin *et al.*, 1996). In *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* sind 30 bis 40 Nukleotide Homologie zwischen eingebrachter DNA und der genomischen Zielsequenz ausreichend, um durch homologe Rekombination Zielgene effizient auszuschalten (Datsenko und Wanner, 2000; Baudin *et al.*, 1993). In höheren Pflanzen sind die Verhältnisse jedoch völlig anders. Selbst sehr große Homologiebereiche von 22 kb in der eingebrachten DNA reichen nicht aus, die *gene targeting*-Frequenz in *Lotus japonicus* signifikant zu steigern (Thykjaer *et al.*, 1997). Da aktuelle Modelle für homologe Rekombinationsprozesse auf der Reparatur von Doppelstrangbrüchen basieren (Paques und Haber, 1999), erscheint die gezielte Induktion dieser Doppelstrangbrüche als eine Möglichkeit zur Effizienzsteigerung der Methode. In transgenen Pflanzen, die eine artifizielle *I-SceI*-Schnittstelle enthielten, wurde das

Restriktionsenzym kurzzeitig exprimiert. Mit Hilfe dieser Strategie konnte die Häufigkeit homologer Rekombinationen *in vivo* auf  $10^{-2}$  gesteigert werden (Puchta *et al.*, 1996).

Leider sind der Anwendung in der Praxis dadurch Grenzen gesetzt, dass die *I-SceI*-Restriktionsschnittstelle nur sehr selten in pflanzlichen Genomen vorkommt und in den meisten Fällen vor einer Nutzung artifiziell eingebracht werden müsste.

Eine andere Möglichkeit zur Erhöhung der homologen Rekombinationsrate ist die Anwendung von Stressfaktoren wie Hitzeschock oder erhöhten Kochsalzkonzentrationen. Diese induzieren keine Doppelstrangbrüche, aber aktivieren Reparaturprozesse an genomischer DNA (Lebel *et al.*, 1993).

Alle bisher vorgestellten Versuche die homologe Rekombination als Werkzeug zur gezielten *in situ*-Modifizierung von Pflanzengenomen zu nutzen, erbrachten keine ausreichenden Effizienzen.

### 1.3 Entdeckung von Triplehelix-Strukturen

Die Wahrscheinlichkeit eines homologen Rekombinationsereignisses kann möglicherweise erhöht werden, wenn die in den Zellkern eingebrachte DNA-Sequenz für eine gewisse Zeit direkt an der homologen Zielsequenz stabilisiert werden könnte. Für den Einsatz als *guide sequence* kommen Triplehelix-bildende Oligonukleotide in Frage.

Die erste Beschreibung von Triplehelix-Strukturen erfolgte durch Felsenfeld *et al.* (1957). Im Gegensatz zu der kurze Zeit vorher durch Watson und Crick beschriebenen Doppelhelix-Struktur (Watson *et al.*, 1953), die aus zwei gegenläufigen DNA-Strängen aufgebaut ist, sind hier drei Polynukleotide an der Ausbildung einer Helix-Struktur beteiligt (s. Abb. 1). Zwei Jahre später konnte durch Hoogsteen gezeigt werden, dass diese dreikettigen Strukturen in Cokristallen aus Adenin- und Thyminderivaten zwar ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindungen entstanden, allerdings nicht durch die aus der DNA-Doppelhelix bekannten *Watson/Crick*-Wasserstoffbrücken (Hoogsteen, 1959). Diese neu beschriebene Form der Bindung, die sich zwischen den Basen eines dritten DNA-Stranges und der DNA-Doppelhelix unter bestimmten Bedingungen ausbildet, wird nach ihrem Erstbeschreiber als *Hoogsteen*-Wasserstoffbrücke bezeichnet. Wesentlich später konnte gezeigt werden, dass das Pyrimidinoligomer parallel zum *Watson/Crick*-Purinstrang in die große Furche der DNA-Doppelhelix eingelagert ist (Moser *et al.*, 1987). In neuerer Zeit wurde eine natürlich vorkommende triplehelicale DNA-Struktur beschrieben, die so genannte H-DNA (*hinged* DNA). Da diese DNA-Struktur nur unter bestimmten Stressbedingungen auftritt, wird ihr eine regulatorische Funktion in der Zelle zugeschrieben (Htun *et al.*, 1989).

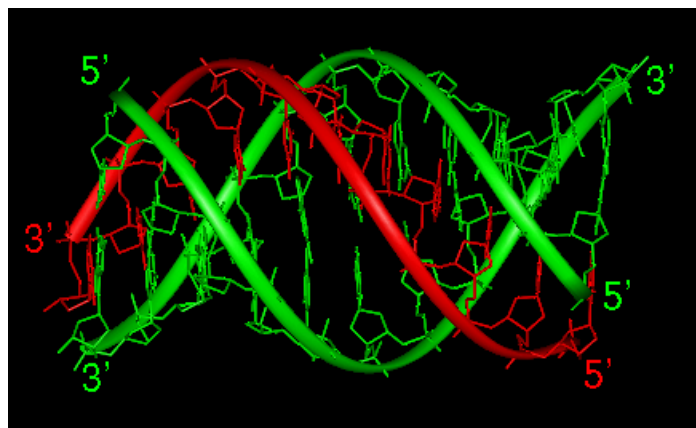
**Abb. 1: Struktur der Triplehelix.**

grün: die DNA-Doppelhelix,  
rot: das Triplehelix-bildende

Oligonukleotid

Quelle:

<http://monod.biomath.nyu.edu/~yangli/pre-research.html>



## 1.4 Struktur der Triplehelix

In der bekannten Struktur der DNA-Doppelhelix beruht die Paarung zweier Basen auf der Ausbildung von *Watson/Crick*-Wasserstoffbrücken. Aufgrund nur einer möglichen tautomeren Konfiguration treten hierbei nur Bindungen zwischen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin auf. Adenin und Thymin (AT) sind hierbei mit zwei, Guanin und Cytosin (CT) dagegen durch drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Durch die Anlagerung einer dritten Base an ein *Watson/Crick*-Basenpaar kann ein Basentriplet gebildet werden. Allerdings ist dies nur an Purinbasen (Adenin, Guanin) möglich. An Pyrimidinbasen (Thymin, Cytosin) kann kein Basentriplet ausgebildet werden. Der Grund hierfür liegt in den für die Ausbildung von *Hoogsteen*-Bindungen notwendigen sterischen Voraussetzungen, die nur von Purinbasen erfüllt werden. Die Anlagerung der dritten Base kann auch in einer um 180° gedrehten Konformation erfolgen und wird dann als reverse *Hoogsteen*-Bindung bezeichnet. Die Bindung mehrerer gekoppelter Basen an Purine eines DNA-Stranges führt zur Einlagerung eines dritten Stranges in die große Furche der DNA-Doppelhelix. Der so gebildete Bereich wird als Triplehelix bezeichnet.

Die Ausbildung von Triplehelix-Strukturen wird durch die Ladungsabstoßung zwischen den negativ geladenen Phosphaten des Doppelstranges und dem ebenfalls negativ geladenen Phosphatrückgrat des dritten Stranges behindert. Dieser Abstoßungsreaktion wird in Anwesenheit positiv geladener Magnesiumionen entgegengewirkt (Majumdar *et al.*, 2003).

Die Bildung der Triplehelix-Struktur erfolgt generell vom 5'-Ende des Oligonukleotids zu dessen 3'-Ende. Dieser gerichtete Aufbau der Triplehelix beruht wahrscheinlich auf der Rechthändigkeit der DNA-Doppelhelix, die den Basen am 5'-Ende des Oligonukleotids stärkere Wechselwirkungen zur Doppelhelix erlaubt als am 3'-Ende (Alberti *et al.*, 2002).

Das Grundverständnis dieser Vorgänge ist notwendig für die Entwicklung Triplehelix-bildender Oligonukleotide.

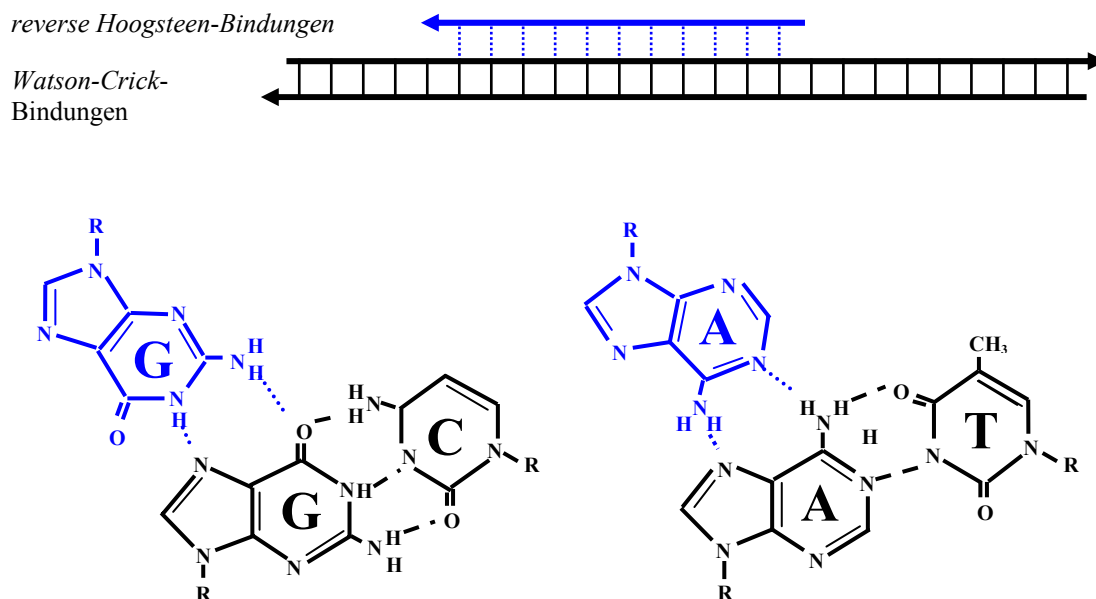
## 1.5 Zielsequenzen für Triplehelix-bildende Oligonukleotide

Die Anlagerung einer dritten Base kann, wie beschrieben, nur nach den Regeln der *Hoogsteen*-Bindung erfolgen. Zusätzlich ist eine stabile Einlagerung eines dritten Stranges in die Große Furche der DNA-Doppelhelix aus sterischen Gründen nur möglich, wenn dessen Basenabfolge der Zielsequenz entspricht. Die Sequenzspezifität der Ausbildung einer Triplehelix ist aufgrund dieser Voraussetzungen vergleichbar mit der *Watson/Crick*-Basenpaarung zweier DNA-Stränge in der Doppelhelix. Da für die Ausbildung von Triplehelices nur Purinabschnitte in Frage kommen, sind nur Gene mit solchen Polypurinabfolgen als Zielsequenz geeignet. Im menschlichen Genom mit seinen etwa 3 Milliarden Basenpaaren ist eine definierte Folge von 17 Basen ausreichend für eine sequenzspezifische Bindung (Thoung *et al.*, 1993). Abschnitte, in denen der Polypurinbereich abwechselnd auf beiden DNA-Strängen vorliegt, können durch Konstruktion entsprechend veränderter Triplehelix-bildender Oligonukleotide genutzt werden (de Bizmont *et al.*, 1996; Olivas *et al.*, 1994). Für das Vorhandensein einzelner Pyrimidine in einer Polypurinsequenz sind Lösungsansätze für die Modifizierung Triplehelix-bildender Oligonukleotide an der entsprechenden *mismatch*-Stelle erarbeitet worden (Fossella *et al.*, 1993; Kukreti *et al.*, 1997 und 1998).

## 1.6 Aufbau Triplehelix-bildender Oligonukleotide

Es werden zwei Grundtypen von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden unterschieden: der Pyrimidin-Typ und der Purin-Typ. Beide Varianten unterscheiden sich in der Art und Weise der Triplehelix-Bildung und haben in der praktischen Anwendung ihre spezifischen Vor- und Nachteile.

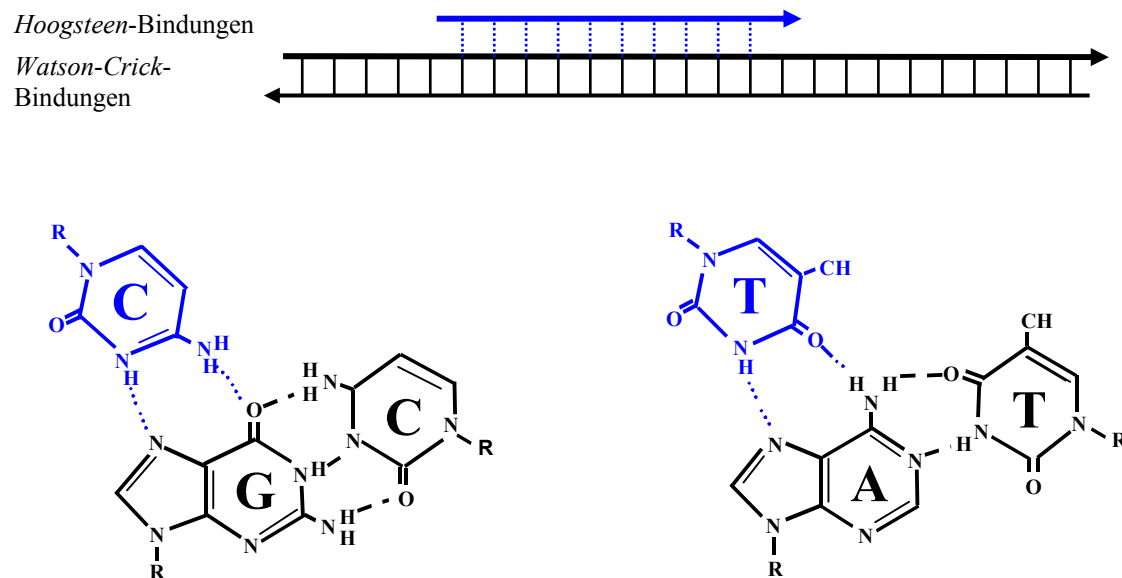
Triplehelix-bildende Oligonukleotide vom Purin-Typ bestehen vollständig aus Purinbasen (Adenin und Guanin) und lagern sich über *reverse Hoogsteen*-Bindungen in antiparalleler Orientierung an den Polypurinbereich der DNA-Doppelhelix an (s. Abb. 2). Die Stärke ihrer Bindung ist abhängig von der Kationenkonzentration des umgebenden Milieus. Einerseits ist eine Mindestkonzentration divalenter Kationen (z.B. Magnesiumionen) für die Ausbildung einer Triplehelix notwendig, andererseits sind monovalente Kationen (z.B. Kaliumionen) hemmend. Unter physiologischen Bedingungen in einer Pflanzenzelle mit relativ geringen frei verfügbaren Konzentrationen von Magnesiumionen zwischen 0,4 und 0,6 mM (Hartwig, 2001) könnten diese Bindungseigenschaften einen Nachteil darstellen. Eine weitere ungünstige Eigenschaft von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden des Purin-Typs ist die Tendenz zur Bildung von selbstassoziierten Dimeren. Dadurch kann in der Lösung eine konkurrierende Reaktion zur Ausbildung von Triplehelices ablaufen und die Effizienz somit verringern (Noonberg *et al.*, 1995).



**Abb. 2: Triplehelix-bildende Oligonukleotide vom Purin-Typ binden in anti-paralleler Orientierung zum Polypurinstrang.**

Die an das Watson/Crick-Basenpaar angelagerte dritte Base und die von ihr ausgebildeten *reversen Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken sind blau, die stabileren *Watson/Crick*-Wasserstoffbrücken sind schwarz dargestellt.

Triplehelix-bildende Oligonukleotide vom Pyrimidin-Typ bestehen vollständig aus Pyrimidinbasen (Cytosin und Thymin) und lagern sich über *Hoogsteen*-Bindungen in paralleler Orientierung an den Polypurinbereich der DNA-Doppelhelix an (s. Abb. 3). Voraussetzung für die Ausbildung einer *Hoogsteen*-Bindung zwischen einer Cytosin-Base und der DNA-Doppelhelix ist die Protonierung des Cytosins am C5-Atom. Diese Protonierung sollte bei sauren pH-Werten in der Zelle vorliegen. Um diesen möglichen Nachteil von Pyrimidin-Oligonukleotiden zu umgehen, wurde die Verwendung von 5-Methyl-Cytosin als Alternative zum normalen Cytosin erarbeitet (Xodo *et al.*, 1991; Grigoriev *et al.*, 1992). Die Fähigkeit von Pyrimidin-Oligonukleotiden, auch in Anwesenheit von Kaliumionen Triplehelices auszubilden, kann einen Vorteil gegenüber den Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden vom Purin-Typ darstellen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden deshalb ausschließlich Triplehelix-bildende Oligonukleotide vom Pyrimidin-Typ verwendet.



**Abb. 3: Triplehelix-bildende Oligonukleotide vom Pyrimidin-Typ binden in paralleler Orientierung zum Polypurinstrang.**

Die an das Watson/Crick-Basenpaar angelagerte dritte Base und die von ihr ausgebildeten *Hoogsteen*-Wasserstoffbrücken sind blau, die stabileren *Watson/Crick*-Wasserstoffbrücken sind schwarz dargestellt.

## 1.7 Aufnahme von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden in die Zelle und Transport in den Zellkern

Für eine effiziente Anwendung Triplehelix-bildender Oligonukleotide müssen diese in ausreichender Menge in die entsprechende Zielzelle eingebracht werden. Im Bereich tierischer Zellkulturen können für diesen Zweck etablierte Transfektionsmechanismen verwendet werden. Durch die Verwendung kommerzieller Systeme auf der Basis von artifiziellen Liposomen können die Aufnahmeraten noch weiter gesteigert werden (Luo und Saltzman, 2000; Gitlin *et al.* 2002). Für pflanzliche Zellen bietet sich neben der Polyethylen-Glycol (PEG)-vermittelten Transformation die Elektroporation als Methode an. Durch kurze elektrische Impulse im Millisekunden-Bereich werden dabei vorübergehend Poren in der Zellmembran geöffnet, durch die Oligonukleotide in das Zytoplasma diffundieren können. Der weitere Transport in den Zellkern scheint ebenfalls passiv zu verlaufen. In Versuchen mit fluoreszierenden Oligonukleotiden und gleichzeitiger chemischer Inaktivierung der Transportproteine der Kernporen konnte ein aktiver Transport in den Zellkern ausgeschlossen werden (Beltinger *et al.*, 1995).

## 1.8 Modifizierungen von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden

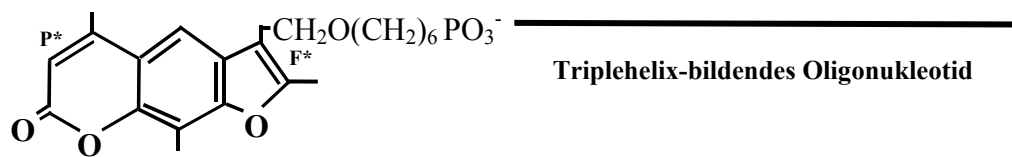
In der praktischen Anwendung sind leider häufig nicht alle Rahmenbedingungen ideal gestaltet. So können zum Beispiel in der Sequenz des zu modifizierenden Zielgens einzelne Pyrimidine in die Polypurinregion eingestreut sein. Oder die Polypurin-Basenfolge liegt nicht durchgehend auf einem DNA-Strang, sondern abwechselnd auf beiden Strängen der DNA-Doppelhelix. Für viele dieser vom Idealzustand abweichenden Bedingungen wurden bereits Lösungen entwickelt (de Bizmont *et al.*, 1996; Olivas *et al.*, 1994; Kukreti *et al.*, 1997 und 1998; Xodo *et al.*, 1993).

Auch die Verbesserung der Bindungseigenschaften von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden unter physiologischen Ionenkonzentrationen war Ziel vieler Forschungsarbeiten. Als ein Beispiel wurde bereits die Methylierung am C5-Atom des Cytosins in Pyrimidin-Oligonukleotiden genannt. Die Verwendung von 2'-O-Methyl-Ribosiden im Rückgrat des Oligonukleotids erhöht die Schmelztemperatur der Triplehelix deutlich. Besonders hilfreich kann diese Modifizierung sein, wenn durch Pyrimidine im Polypurinstrang die Bindungsstärke des Oligonukleotids herabgesetzt ist (Agrawal *et al.*, 1997).

Weitere Modifizierungen zielen auf einen verbesserten Schutz der Triplehelix-bildenden Oligonukleotide vor zellulären Exonukleasen. Zu diesem Zweck werden entweder nur am 3'-Ende oder an beiden Enden des Oligonukleotids Phosphorothioat-Bindungen zwischen den terminalen Basen verwendet (Agrawal *et al.*, 1997).

Eine andere Gruppe von Modifizierungen dient der Erweiterung von Funktionen Triplehelix-bildender Oligonukleotide. Es handelt sich um die Kopplung reaktiver Moleküle an die Oligonukleotidsequenz. Eine besonders wichtige Gruppe sind dabei Moleküle, die sich nach der sequenzspezifischen Ausbildung der Triplehelix zwischen die Basenpaare der DNA-Doppelhelix einlagern können. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Psoralen (s. Abb. 4).

Seine Eigenschaft, nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht kovalente Bindungen mit dem DNA-Strang zu bilden, macht es besonders geeignet für einige methodische Anwendungen der Triplehelix-Technologie (Barre *et al.*, 1999; Giovannangeli *et al.*, 1997).



**Abb. 4: Psoralen-Molekül über eine C6-Kohlenstoff-Brücke gekoppelt an ein Triplehelix-bildendes Oligonukleotid.** Das Psoralen-Molekül entspricht chemisch einer linearen Kondensation eines Furanringes mit einem Coumarinring.  
P\* : reaktive Pyrrol-Bindung; F\* : reaktive Furan-Bindung

Die flache Struktur des Psoralenmoleküls ermöglicht ein Interkalieren in den DNA-Doppelstrang. Dieses geschieht nur an 5'-TpA-3'- und 5'-ApT-3'-Dinukleotiden. Durch die Kopplung des Psoralen-Moleküls über eine C6-Kohlenstoff-Brücke an das Oligonukleotid muss eine geeignete Sequenz nicht direkt im Anschluss an einen Polypurinbereich vorhanden sein. Unter UVA-Bestrahlung erfolgt eine Aktivierung des Psoralen-Moleküls. Diese führt in einem ersten Schritt zur kovalenten Verbindung des Psoralens mit dem Polypurinstrang der DNA-Doppelhelix. Dieses so genannte Monoaddukt kann unter weiterer UVA-Bestrahlung zu einem Bisaddukt weiterreagieren. Dabei reagiert die aktive Bindung am Pyrrolring des Psoralens mit einem Thymin im zum Polypurinstrang komplementären Pyrimidinstrang. Das so entstehende Bisaddukt ist kovalent quervernetzt und mit dem Triplehelix-bildenden Oligonukleotid verbunden (Bates *et al.* 1995; Barre *et al.*, 1999). Diese Bisaddukte können als Grundlage verschiedener Nachweismethoden für die Triplehelixbildung genutzt werden. Die Quervernetzungen von DNA-Strängen werden von zelleigenen Kontrollmechanismen erkannt und führen zur Auslösung von Reparaturvorgängen im Zellkern. Diese Vorgänge führen häufig zur Generierung kleiner Deletionen in der Zielsequenz (Majumdar *et al.*, 1998).

## 1.9 Anwendungen

### 1.9.1 Nutzung von *Hoogsteen*-Bindungen für die sequenzspezifische Anlagerung modifizierender Oligonukleotide - Triplehelix-bildende Oligonukleotide

Der erste Nachweis einer Mutationsaktivität Triplehelix-bildender Oligonukleotide in lebenden Organismen eröffnete Perspektiven für eine breite *in vivo*-Anwendung dieser neuen Technologie. Als Zielsequenzen dienten in transgenen Mäusen chromosomal integrierte Reportergene, die in einzelnen Basenpaaren durch Insertionen und Deletionen modifiziert wurden. Als mögliche Erklärung für diese Veränderungen der Zielsequenz wurde eine Beteiligung von *nucleotide excision/repair*-Mechanismen diskutiert (Vasquez *et al.*, 2000 und 2001).

Luo *et al.* (2000) zeigten, dass Triplehelix-bildende Oligonukleotide (TFOs) sowohl mit gekoppeltem Psoralen, als auch ohne dieses zusätzliche reaktive Molekül, die Rate von Rekombinationsereignissen in bestimmten chromosomalen Regionen gezielt steigern können. Dazu wurden im Genom von Mauszellen zwei mutierte inaktive Kopien eines Thymidinkinase-Gens, getrennt durch einen 30 Basen langen Polypurinbereich, in direkter Wiederholung integriert. Die Injektion von TFOs ohne Psoralen in die Mauszellen führte in

1,0% der behandelten Zellen zu einer Wiederherstellung der Thymidinkinase-Funktion durch Rekombinationen zwischen den beiden Gen-Loci. Bei Verwendung von TFOs mit Psoralen und der anschließenden Bestrahlung mit UVA erhöhte sich diese intrachromosomale Rekombinationsrate sogar auf 1,2 % und lag damit 2500-fach über der Hintergrundrate (Luo *et al.*, 2000).

Ein wichtiger Aspekt der Anwendung Triplehelix-bildender Oligonukleotide ist die Sequenzspezifität der eingebrachten Modifizierungen. Zur Klärung dieser Thematik wurden von Majumdar *et al.* (1998) *in vivo*-Versuche mit Eizellen des Chinesischen Hamsters durchgeführt. In deren Genom wurde ein Zielgen mit einer 23 bp Polypurinsequenz lokalisiert, die durch eine Pyrimidinbase unterbrochen war. Direkt angrenzend befand sich ein 5'-TpA-3'-Dinukleotid, geeignet zum Interkalieren von Psoralen. Es wurden verschieden lange und unterschiedlich modifizierte Oligonukleotidvarianten eingesetzt. Die beste erreichte Modifizierungseffizienz lag bei 0,12 %. Die modifizierten Zellklone wurden auf unbeabsichtigte Veränderungen zweier benachbarter Polypurinsequenzen im gleichen Zielgen untersucht. Es konnte keine unspezifische Sequenzveränderung gefunden werden.

Diese Arbeiten unterstreichen die Sequenzspezifität Triplehelix-bildender Oligonukleotide bei der gezielten Modifizierung chromosomaler Loci.

### **1.9.2 Nutzung von *Watson-Crick*-Bindungen für die sequenzspezifische Anlagerung modifizierender Oligonukleotide – Chimäre Oligonukleotide**

Da die Triplehelix-Bildung über *Hoogsteen*- bzw. reverse *Hoogsteen*-Bindungen ausschließlich in Polypurinbereichen stattfinden kann, bleibt die Anwendung Triplehelix-bildender Oligonukleotide auf Zielgene mit Polypurinbereichen beschränkt. Bei Verwendung von DNA-Oligonukleotiden, die nach Einwanderung in den DNA-Doppelstrang über *Watson-Crick*-Bindungen an die entsprechenden Zielsequenzen binden (*displacement-loop*), ist diese Einschränkung nicht gegeben. Diese Oligonukleotide benötigen für den *in vivo*-Einsatz eine Stabilisierung ihrer Struktur.

Eine Möglichkeit zur Stabilisierung der DNA-Sequenz besteht in der Verwendung einer an die DNA-Sequenz gekoppelten homologen RNA-Sequenz. Durch Hybridisierung beider Sequenzabschnitte entsteht eine Haarnadel-Struktur. Aufgrund der Zusammensetzung aus einer DNA-Sequenz zur Bindung und Modifizierung des Zielgens und einer homologen RNA-Sequenz zur Stabilisierung werden diese Oligonukleotide als chimäre Oligonukleotide bezeichnet.

Arbeiten mit chimären Oligonukleotiden in zellfreien Extrakten aus Säugerzellen erbrachten bei der Korrektur von Punktmutationen im Zielgen Effizienzen von 0,1 %. Die Deletion einer Einzelbase wurde mit 0,005 % Häufigkeit revertiert (Cole-Strauss *et al.*, 1999).

Auch im pflanzlichen System wurden chimäre Oligonukleotide eingesetzt. In Versuchen mit Mais-Zellkulturen wurden durchschnittliche Effizienzen zwischen  $1,0$  und  $1,5 \times 10^{-4}$  erreicht (Zhu *et al.*, 1999). Diese lagen um drei bis vier Größenordnungen über der spontanen Mutationsrate von  $10^{-7}$  bis  $10^{-8}$ . In den Versuchen wurde ein endogenes Maisgen, die Acetohydroxyacid-Synthase (AHAS), durch Partikelbeschuss mit chimären Oligonukleotiden in einer Base modifiziert. Diese Sequenzmodifizierung führte in den betroffenen Zellen zur Ausprägung einer Herbizidresistenz. In den auf Selektionsmedium regenerierten Pflanzen konnte die erwartete Sequenzänderung nachgewiesen werden. Das auf diese Weise modifizierte Allel wurde gemäß den Mendelschen Regeln auf die folgende Generation vererbt (Zhu *et al.*, 2000).



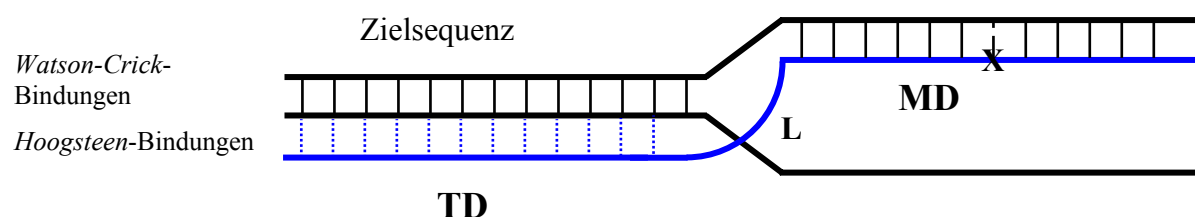
Chimäre Oligonukleotide wurden auch hinsichtlich der Sequenzspezifität der beabsichtigten Modifizierung untersucht. Beetham *et al.* (1999) verwendeten zur Modifizierung der Acetolactat-Synthase in Tabak ein chimäres Oligonukleotid mit einer 15 Basen langen Homologieregion zum Genlocus SuRB. Eine Modifizierung in einem homologen Gen (SuRA) wurde in keinem Fall gefunden, obwohl sich die homologe Sequenz in nur einer Base unterschied.

Gamper *et al.* (2000a) untersuchten die Wirkungsweise chimärer Oligonukleotide in humanen zellfreien Extrakten. Aufgrund ihrer Ergebnisse postulierten sie einen möglichen Mechanismus für die Funktion chimärer Oligonukleotide, nach dem der DNA-Strang die Genkorrektur vermittelt. Schließlich wiesen die Autoren sogar nach (Gamper *et al.*, 2000b), dass der DNA-Strang von chimären RNA/DNA-Oligonukleotiden alleine Prozesse der Genreparatur und –konversion vermitteln kann. Einzelsträngige DNA-Oligonukleotide, die durch eine definierte Anzahl von Phosphorothioat-Bindungen im Zucker-Phosphat-Rückgrat stabilisiert waren, zeigten in animalen und pflanzlichen zellfreien Extrakten sogar höhere Effizienzen im Reparaturprozess als die ursprünglichen chimären Strukturen.

### 1.9.3 Kombinierte Nutzung von *Hoogsteen*-Bindungen und *Watson-Crick*-Bindungen für die sequenzspezifische Anlagerung modifizierender Oligonukleotide - Bifunktionelle Oligonukleotide

In bifunktionellen Oligonukleotiden ist eine Triplehelix-bildende Domäne (Ausbildung von *Hoogsteen*-Bindungen) mit einer Mutations-Domäne (Ausbildung von *Watson-Crick*-Bindungen) kombiniert (s. Abb. 5). Die Kombination zweier unterschiedlicher funktioneller Domänen eröffnet neue Einsatzmöglichkeiten.

Einerseits wird die Auswahl zugänglicher Zielsequenzen erweitert, da die direkt oder über eine kurze Linkersequenz gebundene Mutations-Domäne (MD) im Gegensatz zur Triplehelix-bildenden Domäne (TD) auch nicht-Polypurinbereiche modifizieren kann. Andererseits begünstigt die durch die TD bewirkte Verankerung des Oligonukleotids an der Zielsequenz die Ausbildung von *displacement loops* (D-Loops) durch die MD. In der Mutationsdomäne vorhandene Sequenzmodifikationen können durch Reparaturprozesse Basenaustausche in der Zielsequenz herbeiführen.



**Abb. 5: Bifunktionelle Oligonukleotide sind aus zwei Domänen aufgebaut.** Die Triplehelix-bildende Domäne (TD) bindet über *Hoogsteen*-Bindungen bzw. reverse *Hoogsteen*-Bindungen (gepunktet) an die Zielsequenz. Die über eine *Linker*-Sequenz (L) gekoppelte Mutationsdomäne (MD) bildet nach lokal begrenzter Auflösung des DNA-Doppelstranges *Watson-Crick*-Bindungen mit der Zielsequenz aus (*displacement loop*). Durch homologe Rekombinationsprozesse wird aufgrund einer in der MD enthaltenen fehlpaarenden Base (X) ein Basenaustausch in der Zielsequenz herbeigeführt.

Gamper *et al.* (1998) verwendeten in einer Arbeit mit bifunktionellen Oligonukleotiden ein Plasmid mit einer 20 bp langen Polypurinregion als Zielsequenz. Zum besseren Nachweis von *D-Loop*-Strukturen wurden in die Mutationsdomäne reaktive Gruppen eingebaut, die eine ausgebildete *D-Loop*-Struktur in dieser Position fixierten. Der Nachweis erfolgte anhand eines veränderten Laufverhaltens im Agarosegel und durch S1-Nuclease-Assays. Die Arbeit zeigte, dass die verwendeten bifunktionellen Oligonukleotide die postulierte Funktion im *in vitro*-Versuch sowohl mit linearisierter DNA als auch mit superspiralisierter Plasmid-DNA erfüllten.

Kurze Zeit später erfolgte die erste Anwendung von bifunktionellen Oligonukleotiden zur Genmodifizierung in lebenden Zellen (Culver *et al.*, 1999). Als Testsystem diente eine Kultur menschlicher Lymphozyten. Im Zielgen, einer Adenosin-Deaminase (ADA), sollte eine Punktmutation korrigiert werden. Nach der Transfektion der Lymphozyten mit den entsprechenden bifunktionellen Oligonukleotiden wurden diese für drei bzw. sechs Tage unter selektionsfreien Bedingungen weiterkultiviert. Anschließend wurden DNA-Extrakte der Zellkulturen mittels PCR und Restriktionsanalyse auf die Korrektur der Punktmutation untersucht. Abhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen zeigten zwischen 1,2 % und 1,6 % der transfizierten Zellen die gewünschte Korrektur der Punktmutation im ADA-Gen. Weder durch die Triplehelix-bildende Domäne noch durch die Mutationsdomäne allein konnte eine messbare Genmodifizierung erreicht werden. Durch die Synergieeffekte im Zusammenwirken beider Domänen konnte die Modifizierungsrate von einem nicht detektierbaren spontanen Hintergrund auf bis zu 1,6 % gesteigert werden.

Chan *et al.* (1999) konnten in Säugerzellen die Modifizierung eines auf einem Plasmid befindlichen mutierten Reportergens mit Hilfe von bifunktionellen Oligonukleotiden nachweisen. Durch Synergieeffekte im Zusammenwirken der Triplehelix-bildenden Domäne und der Mutationsdomäne lag die Effizienz der bifunktionellen Oligonukleotide mindestens dreifach über der Effizienz der einzeln oder ungekoppelt verwendeten Domänen.

Diese Arbeit zeigt eindrucksvoll das Potential dieser neuen Technologie in tierischen Zellen.

## 1.10 Modellpflanzen

In der vorliegenden Arbeit wurden Kartoffel und *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanzen verwendet.

Die Kartoffel stellt aufgrund ihrer guten Eignung für die Gewebekultur eine ideale Modellpflanze dar. Als Zielgen wurde das im Kartoffel-Genom vorhandene Gen für die *granule-bound starch synthase I* (gbssI) verwendet. Es enthält eine für die Triplehelix-Bildung notwendige Polypurin-Sequenz. Das Gen ist für die Bildung von Amylose verantwortlich. Wird es inaktiviert, liegt in der Knolle überwiegend die technisch gut zu verarbeitende Amylopektinstärke vor. Allerdings müssen nach der Inaktivierung eines Allels des gbssI-Gens durch die *in situ*-Mutagenese zur Ausprägung des gewünschten Phänotyps homozygote Pflanzen erstellt werden.

Als zweite Modellpflanze wurde die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) in die Arbeiten einbezogen. Sie verfügt über eine sehr kurze Generationsdauer und lässt sich durch ihre Anspruchslosigkeit und ihren kleinen Wuchs sehr gut im Gewächshaus kultivieren. Außerdem ist *A. thaliana* genetisch bereits sehr gut charakterisiert und der Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* gut zugänglich.

## 1.11 Strategien zur Durchführung des Projektes

Aufbauend auf den in jüngster Zeit im tierischen System erarbeiteten Grundlagen sollte in der vorliegenden Arbeit die Eignung Triplehelix-bildender und bifunktioneller Oligonukleotide zur *in situ*-Modifizierung von Pflanzengenomen am Beispiel des gbssI-Gens der Kartoffel untersucht werden.

### 1.11.1 Modellsysteme auf der Basis des Gens für das *green fluorescent protein* (gfp)

Zur schnellen Testung der Effektivität der verwendeten Varianten Triplehelix-bildender und bifunktioneller Oligonukleotide sollte ein transientes System eingesetzt werden. Auf der Basis eines gfp-Modellgens sollten ohne lange Phasen der Regeneration von Pflanzen in kurzer Zeit besonders effektive Varianten modifizierender Oligonukleotide ausgewählt werden können.

In Protoplasten transgener Modellpflanzen sollte mit Hilfe Triplehelix-bildender und bifunktioneller Oligonukleotide ein zunächst inaktives Modellgen aktiviert werden. Dieses Modellgen wurde als Fusion eines Abschnitts aus dem gbssI-Gen der Kartoffel mit der gfp-Sequenz erstellt. Die gezielte Modifizierung eines zwischen den Gensequenzen gelegenen Stop-Codons in ein Sinn-Codon sollte die Aktivierung des Modellgens bewirken.

Die zuerst geplante Variante enthielt einen mit 550 bp relativ langen Sequenzbereich des gbssI-Gens mit der darin vorkommenden Polypurinsequenz.

Um mögliche, im konkreten Einzelfall nicht vorhersagbare, Beeinträchtigungen der Funktionalität des gfp-Fusionsgens durch die angefügte gbssI-Sequenz zu minimieren, wurde eine weitere Variante des Modellgens in die Planung einbezogen. Diese verkürzte Variante enthielt nur die für die Ausbildung von Triplehelices unbedingt notwendige 27 bp lange Polypurinsequenz.

### 1.11.2 Modellsystem auf der Basis des Bialaphos-Resistenzgens (bar)

Die im transienten gfp-System als besonders geeignet gefundenen Varianten Triplehelix-bildender und bifunktioneller Oligonukleotide sollten anschließend in einem auf dem bar-Gen basierenden Selektionssystem genauer untersucht werden. Das bar-Modellgen sollte dazu aus der 27 bp langen Polypurinsequenz des gbssI-Gens und der cDNA des bar-Gens konstruiert werden. Auch in diesem System lag ein Stop-Codon zwischen beiden Bereichen. Dieses sollte zu einem Sinn-Codon modifiziert werden und dadurch die Aktivierung des Modellgens bewirken.

Das Selektionssystem sollte neben Ergebnissen zur Effizienz der einzelnen Oligonukleotide zusätzlich die Möglichkeit zur Analyse der Sequenzspezifität der durchgeführten Modifizierung in regenerierten transgenen Linien bieten.

Abschließend sollte eine Einschätzung bezüglich der Praxisrelevanz Triplehelix-bildender und bifunktioneller Oligonukleotide zur *in situ*-Modifizierung des untersuchten Kartoffelgens gbssI gegeben werden.



## 2 Material

### 2.1 Geräte

Bezeichnung (Markenname)	Quelle
Autoklaven (Sanoclav <sup>®</sup> ) (Certoclav <sup>®</sup> ) (2540 ELC <sup>®</sup> )	Wolf, Geislingen Traun, Österreich Systec, Wettenberg
Binokular (Stemi <sup>®</sup> 2000-C)	Zeiss, Jena
Blottingapparatur für Western Blot (PerfectBlue <sup>™</sup> Elektrobloetter <sup>™</sup> Sedec M)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Confocales Laserscanning Mikroskop (TCS SP2)	Leica, Bensheim
Dynal MPC <sup>®</sup> -S	Dynal, Hamburg
Elektroporator (Gene Pulser <sup>®</sup> )	BIO-RAD, München
Gelelektrophoresekammern	Eigenbau BBA, Braunschweig
Gelelektrophoresekammern, vertikal (Mighty Small II SE 250)	Hoefer Scientific Instruments
Inkubationsschüttler (Novotron <sup>®</sup> )	Infors, Bottmingen
Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD)	Zeiss, Jena
Klimaschrank (Rumed <sup>®</sup> )	Rubarth, Hannover
Laborrührer	Heidolph, Retheim
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop <sup>®</sup> 20)	Zeiss, Jena
pH-Meter (inoLab <sup>®</sup> pH Level 1)	WTW, Weilheim
Photoapparatur für Agarosegele	Intas, Hannover
Photometer (BioPhotometer <sup>®</sup> )	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Gilson, Bad Camberg Eppendorf, Hamburg
Reinstwassersystem (UltraClear <sup>®</sup> )	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Schlauchpumpe easy <sup>®</sup> -Load	Millipore, Molsheim
Sterilwerkbank (Herasafe <sup>®</sup> )	Heraeus, Hanau
Thermocycler (MaxiCycler <sup>®</sup> PTC-100)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Thermomixer (comfort)	Eppendorf, Hamburg
Titertek Multiscan MC	Flow Laboratories
UV-Crosslinker (CL-1000)	UVP, USA
UV-Transilluminator (BIL-200-K)	Bachofer, Reutlingen
Vortexgerät (Vortex <sup>®</sup> Genie 2)	Scientific Industrie
Waagen (H 160, PT 600)	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge (Centrifuge 5402)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (RC-5B)	Sorvall, Bad Homburg

## 2.2 Chemikalien

Für die hier beschriebenen Experimente wurden analysenreine Chemikalien und Nährmedien der folgenden Firmen verwendet:

Firma	Sitz
Difco	Detroit, MI, USA
Duchefa	Haarlem, Niederlande
Fluka	Buchs, Schweiz
MBI Fermentas	St.Leon-Rot
Merck	Darmstadt
Riedel-de-Haën	Seelze
Roth	Karlsruhe
Roche	Mannheim
Serva	Heidelberg
Sigma	Taufkirchen

## 2.3 Enzyme

Bezeichnung	Quelle
Cellulase Onozuka R 10	Serva, Heidelberg
Driselase	Fluka, Buchs, Schweiz
Macerozym R 10	Serva, Heidelberg
DNA-Polymerase rTaq	Takara, Shiga, Japan
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim; MBI Fermentas, St.Leon-Rot; Takara, Shiga, Japan

## 2.4 Spezielle Chemikalien und kommerzielle Komplettsysteme

Bezeichnung	Quelle
Agarose	Serva, Heidelberg
Antibiotika	Duchefa, Haarlem, Niederlande
BCIP/NBT <i>Color Substrate</i>	Promega, Mannheim
DNA Marker	Roche, Mannheim
GelStar <sup>®</sup> Nucleic Acid Gel Stain	Biozym, Hess. Oldendorf
MDE <sup>®</sup> Gel Solution	Biozym, Hess. Oldendorf
CRYOBANK <sup>™</sup>	Mast Diagnostica, Reinfeld
Nucleobond <sup>®</sup> AX	Macherey&Nagel, Düren
Nucleospin <sup>®</sup> Plasmid	Macherey&Nagel, Düren
Nucleospin <sup>®</sup> ExtractII	Macherey&Nagel, Düren
PAT-ELISA-Test	Steffens, Ebringen

Phytohormone	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Proteinmarker, <i>prestained protein ladder 10-180 kDa</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
REExtract-N-Amp <sup>®</sup>	Sigma, St. Louis, USA
Plant PCR Kit	
SuperScript <sup>™</sup> One-Step	Invitrogen, Karlsruhe
RT-PCR System mit Platinum <sup>®</sup> Taq	
DNA Polymerase	

## 2.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Quelle
Blottingmembran für Protein (Hybond <sup>™</sup> -P)	Amersham Biosciences, Freiburg
Einmalpipetten (Liquipette <sup>®</sup> 1,5; 3 ml)	Elkay, Costelloe, USA
Einmalreaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
Küvetten für Elektroporation (0,2 cm gap und 0,4 cm gap)	Biorad, Hercules, USA
Membran Hybond <sup>™</sup> -P	Amersham Biosciences, UK
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm <sup>®</sup> M	Pechiney Plastic Pack., Chicago, USA
PCR-Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Petrischalen (ohne Nocken)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Petrischalen (mit Nocken 35/10, 94/16, 100/20)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Millex <sup>®</sup> -GP <sub>50</sub>	Millipore, Molsheim
Streptavidinbeads (Dynabeads M-280 <sup>®</sup> )	Dynal, Hamburg

## 2.6 DNA

### 2.6.1 Zielgensequenz

Das Gen für die *granule bound starch synthase* (gbssI) enthält einen 27 Basenpaare langen Polypurin-Bereich und ist von entscheidender Bedeutung für die Stärkesynthese. Die cDNA dieses Gens, von Exon 3 bis Exon 8, wurde deshalb für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente als Zielsequenz verwendet.

### 2.6.2 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von SIGMA-Genosys, Steinheim bezogen.

In Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden wurde zur Verbesserung der Bindungseigenschaften 3-Methylcytosin anstelle des üblichen nicht methylierten Cytosins verwendet.

**Tab. 1: Oligonukleotide zur Untersuchung der Triplehelixbildung *in vitro* und *in situ***

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
PsoBio6	CTCTTCTCCCTTCTCTCTTTCTTT	Triplehelix-bildendes Oligonukleotid für die magnetische Separation
PsoBioKo1	CTCTTCTCCCTTCTCTCTTTCTTT	Ko.-Oligonukleotid ohne Biotin
PsoBioKo2	TCCTTTCTCCCTTCTCTTTCTTTCT	Ko.-Oligonukleotid mit Zufalls-Sequenz
Retard	CTCTTCTCCCTTCTCTCTTTCTTTT	Triplehelix-bildendes Oligonukleotid für die Gelretardation
Zielsequenz +	TTTTCTTTCTCTCTTCCCTCTTCTC	Zielsequenz für Retard zus. mit Zielsequenz-, nur Pyrimidin
Zielsequenz -	GAGAAGAGGGAAGAGAGAGAAAGAAA	Zielsequenz für Retard zus. mit Zielsequenz+, nur Purin
Kontrollsequenz 1+	TCCTTTCTCCCTTCTCTTTCTTTCT	Zielsequenz für Retard zusammen mit Kontrollsequenz-
Kontrollsequenz 1-	AAGGAAAGAAAGAGAAGGGAGAAAGGA	Zielsequenz für Retard zusammen mit Kontrollsequenz+



Tab. 2: Oligonukleotide zur Modifizierung des gfp-Modellgens

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
bi4gfp	TTACCCATGGTTTGGAGAAGAGGGAAT TTCTCTCTCTTTCTTTT	bifunktionelles Oligonukleotid für das gfp-Modellgen
bi5gfp	AACTTGTTCTCCTTTACCCATGGTTTGG AGAAGTTTCCCTTCTCTCTCTT	bifunktionelles Oligonukleotid für das gfp-Modellgen
bi6gfp	AACTTGTTCTCCTTTACCCATGGTTTGG AGAAGTCCCTTCTCTCTCTT	bifunktionelles Oligonukleotid für das gfp-Modellgen
MDgfp	TCCTTTACCCATGGTTTGGAGAAGAGGG AAGAGAGAGAAAGAAAA	nur Mutationsdomäne für das gfp-Modellgen
bi4gfpT	T-TTACCCATGGTTTGGAGAAGAGGGA TTTCTCTCTCTTTCTTTT	bifunktionelles Oligo für das gfp- Modellgen mit TAMRA
bi5gfpT	T-AACTTGTTCTCCTTTACCCATGGTTT GAGAAGTTTCCCTTCTCTCTCTT	bifunktionelles Oligo für das gfp- Modellgen mit TAMRA

Tab. 3: Oligonukleotide zur Modifizierung des bar-Modellgens

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
bi4bar	GGGCCATGGTTTGGAGAAGAGGGAAT TTCTCTCTCTTTCTTTT	bifunktionelles Oligo für das bar- Modellgen
bi5bar	CGGGCGTCGTTCTGGGCCCATGGTTTGG AGAAGTTTCCCTTCTCTCTCTT	bifunktionelles Oligo für das bar- Modellgen
bi6bar	CGGGCGTCGTTCTGGGCCCATGGTTTGG AGAAGTCCCTTCTCTCTCTT	bifunktionelles Oligo für das bar- Modellgen
MDbar	TTCTGGGCCATGGTTTGGAGAAGAGG GAAGAGAGAGAAAGAAAA	nur Mutationsdomäne für das bar-Modellgen

Tab. 4: Primer für PCR-Nachweise

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
35S-Prom.	GAGCATCGTGGA AAAAGAAGA	PCR-Nachweis
5'GFP	TCCTCGGCCACAAGTTGG	PCR-Nachweis, magnetische Separation
3'GFP	CCATGCCATGTGTAATCC	PCR-Nachweis, magnetische Separation
GFP-	TAGTTCATCCATGCC	PCR-Nachweis
BAR-	GCGTCCCGCAGACGGACGAGG	PCR-Nachweis
RT_5'GFP	GGAGAAGAACTTTTCACTGG	RT-PCR
RT_3'GFP	TTGTATAGTTCATCCATGCC	RT-PCR
35S-RT	CATCGTGGA AAAAGAAGACG	RT-PCR
pat-RT	GATGTAGTGGTTGACGATGG	RT-PCR
patseq	GCGTCCCGCAGACGGACGAGG	Sequenzierung

### 2.6.3 Plasmide

Für die Klonierungsarbeiten und die Transformation der Pflanzenzellen wurden folgende Plasmide verwendet:

#### **pLH7000** (Hausmann u. Töpfer, 1999)

Dieser Binärvektor wurde für die Transformation von Protoplasten verwendet. Er enthält das *bar*-Gen für die Selektion mit Bialaphos bzw. Phosphinothricin der T-DNA.

#### **pLH9000** (Hausmann u. Töpfer, 1999)

Dieser Binärvektor wurde für die Transformation von Protoplasten verwendet. Er enthält das *nptII*-Gen in der T-DNA, so dass die transgenen Pflanzen mit Kanamycin selektiert werden konnten.

#### **pCK gfp S65C** (Reichel *et al.*, 1996)

Dieses Plasmid besitzt einen 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) mit einem duplizierten Transkriptionenhancer gleicher Herkunft. Daran schließt sich ein Translationsenhancer aus dem *tobacco etch virus* an. Darauf folgt eine zur Verstärkung der Fluoreszenz modifizierte gfp-cDNA-Sequenz. Diese wird terminiert durch ein Polyadenylierungssignal aus dem CaMV. Der Rest des Plasmides entspricht einem herkömmlichen pUC 18-Vektor.

#### **pGJ304** (G. Jach, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid besitzt einen verdoppelten 35S-Promotor aus dem CaMV. Daran schließt sich ein Translationsenhancer an. Darauf folgt ein für die Expression in Pflanzen optimiertes gfp-Gen. Dieses wird terminiert durch ein Polyadenylierungssignal aus dem CaMV. Der Rest des Plasmides entspricht einem herkömmlichen pUC 18-Vektor.

#### **pRT mgfp5-ER** (Siemering *et al.*, 1996)

Dieses Plasmid basiert auf dem Vektor pRT103 (Töpfer *et al.*, 1987). In der *multiple-cloning-site* befindet sich die modifizierte Sequenz eines gfp-Gens. Am 5'-Terminus ist als ER-Lokalisierungssignal die *basic chitinase signal sequence* aus *Arabidopsis thaliana* fusioniert. Zur Retardation des GFP-Proteins im ER befindet sich am 3'-Terminus des gfp-Gens eine HDEL-Sequenz.

## 2.7 Bakterienstämme

*Escherichia coli* K12 (im Folgenden mit *E.coli* bezeichnet)

XL1-Blue für die Vermehrung von Plasmiden eingesetzter Stamm (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(rk-, mk+), *supE44*, *relA1*,  $\lambda^-$ ; *lac^-*, [F', *proAB*, *lacI<sup>q</sup>* $\Delta$ ZM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]  
Referenz: Bullock *et al.*, 1987

*Agrobacterium tumefaciens* (im Folgenden mit *A. tumefaciens* bezeichnet)

GV3101 für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* (L.) Columbia eingesetzter Bakterienstamm (C58C1 Rif<sup>r</sup> mit Helferplasmid pMP90 8Gm<sup>r</sup>)  
Referenz: Koncz und Schell, 1986  
LBA4404 für die Transformation von *Solanum tuberosum* var. Tomensa eingesetzter Bakterienstamm (Rif<sup>r</sup> mit Helferplasmid pAL4404 Strep<sup>r</sup>)  
Referenz: Hoekema *et al.*, 1983

## 2.8 Medien

### 2.8.1 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

Die Medien wurden 18 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Antibiotika wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren dem handwarmen Medium zugegeben.

LB-Medium (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989):

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l NaCl  
15 g/l Micro-Agar, nur für Festmedium  
pH 7,0 (NaOH)

### 2.8.2 Medien für die Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

YEB-Medium

5 g/l Fleischextrakt (Gibco)  
1 g/l Bacto Hefeextrakt  
5 g/l Bacto Trypton  
5 g/l Saccharose  
15 g/l Micro-Agar, nur für Festmedium  
pH 7,4

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 2 ml/l 1M MgSO<sub>4</sub>.

SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

20 g/l Trypton  
5 g/l Hefe-Extrakt  
584 mg/l NaCl  
186 mg/l KCl  
pH 6,5

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 5 ml/l einer 2 M MgCl<sub>2</sub>- Stammlösung (autoklaviert) und Zugabe von 10 ml/l einer 2 M Glukose-Lösung (sterilfiltriert).

### 2.8.3 Medien für die Kultivierung von *Solanum tuberosum*

MS-Medium (modifiziert nach Murashige und Skoog, 1962):

Es wurde das Fertigmedium mit Vitaminen (Prod. Nr. MO222.0050) der Firma Duchefa verwendet.

4,6 g/l MS Medium mit Makro-, Mikroelementen und Vitaminen  
20 g/l Saccharose  
10 g/l Agar, nur für Festmedium  
pH 5,7 (KOH)

Zur Kultivierung von Protoplasten und während der frühen Phasen der Regeneration von Mikrocalli wurde das SKM-Medium verwendet.

SKM-Medium (Hunt und Helgeson, 1989):

1,9	g/l KNO <sub>3</sub>
0,35	g/l MgSO <sub>4</sub>
0,6	g/l CaCl <sub>2</sub>
0,68	g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,3	g/l KCl
1,0	g/l Mikroelemente Gamborg B5
9,75	g/l Saccharose
11,0	g/l Glucose
39,75	g/l Mannit
0,25	g/l Fructose
0,25	g/l Ribose
0,25	g/l Xylose
0,25	g/l Mannose
0,25	g/l Rhamnose
0,25	g/l Cellobiose
0,25	g/l Sorbitol
50,0	mg/l Inositol
5,0	mg/l Nicotinsäure
0,5	mg/l Pyridoxin-HCl
2,0	mg/l Thiamin-HCl
0,5	mg/l Calciumpanthothenat
0,01	mg/l Aminobenzoesäure
0,2	mg/l Folsäure
0,005	mg/l Biotin
0,5	mg/l Cholinchlorid
0,1	mg/l Riboflavin
1,0	mg/l Ascorbinsäure
1,0	mg/l BAP
0,4	mg/l NAA
250,0	mg/l Caseinhydrolysat
	pH 5,6 (KOH)
2,0	g/l BSA (fettsäurefrei) sterilfiltrieren
22,0	ml/l Kokosnusswasser

Für die Kultivierung von Kalli und zur Induktion der Sprossregeneration wurde das RJM-Medium eingesetzt.

### RJM-Medium (Masson *et al.*, 1988):

2,65	g/l MS-Makro- und Mikroelemente (mod. Nr.4, Duchefa)
1,0	g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
103,1	g/l MS-Vitamine
10	g Saccharose
15	g Mannit
0,5	mg IES
0,5	mg BAP
1,0	mg Zeatin
1,0	mg GA <sub>3</sub>
	pH 5,8
6,0	g/l Agar

## 2.9 Pflanzenmaterial

Für die durchgeführten Arbeiten wurden Pflanzen von *Solanum tuberosum* der Sorte Tomensa verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde von der Bioplant GmbH, Ebstorf zur Verfügung gestellt.

Das Saatgut von *Arabidopsis thaliana* (Columbia) wurde von A. Holk (Universität Hannover) zur Verfügung gestellt.

## 3 Methoden

### 3.1 Kulturverfahren und Stammhaltung von *E. coli*

#### 3.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium unter Schütteln oder auf LB-Agarplatten bei 37°C über Nacht. Plasmidhaltige Stämme wurden grundsätzlich unter Selektionsdruck, also unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika zum Medium, kultiviert.

#### 3.1.2 Kompetente *E. coli*-Kulturen

Für die Transformation von *E. coli* wurden Kulturen benötigt, die speziell für die DNA-Aufnahme vorbereitet wurden. Für die Elektroporation wurden diese Kulturen mit Glycerin gemischt und in 40 µl-Portionen bei –70°C gelagert.

Zur Gewinnung kompetenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 3 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2-0,3 bei 220 rpm und 37°C inkubiert. Zur verbesserten Versorgung mit Sauerstoff wurde die Kultur in 250 ml-Portionen in großen Erlenmeyerkolben mit Schikanen angezogen. Nach Erreichen der entsprechenden Zelldichte wurde die Kultur 30 min auf Eis gestellt. Auch alle anderen benötigten Lösungen wurden auf Eis vorgekühlt. Die anschließenden Zentrifugationsschritte erfolgten alle für 15 min bei 4°C und 5.000 rpm. Nach der ersten Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet in 500 ml sterilem Wasser vorsichtig resuspendiert. Danach folgten drei Zentrifugationsschritte, nach denen das Pellet zunächst in 250 ml sterilem Wasser, dann in 10 ml 10 % Glycerin und zum Schluss in einem Endvolumen von 2-3 ml 10 % Glycerin aufgenommen wurde. Die kompetenten Zellen wurden wie oben beschrieben portioniert und gelagert.

#### 3.1.3 Stammhaltung von Bakterienkulturen

Zur längerfristigen Lagerung der transformierten Bakterienstämme wurden Sicherheitskulturen mit dem Mikrobank<sup>®</sup>-System von Pro-Lab Diagnostik angelegt. Bei diesem System werden poröse Keramikkügelchen als Anheftungsmaterial für die Bakterien verwendet. Die mit Bakterien beladenen Kügelchen werden in Kryogefäßen gelagert.

Ein Kryogefäß wurde unter sterilen Bedingungen mit 1 ml einer frischen über Nacht gewachsenen Kultur beimpft. Nach ca. 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Medium entfernt und das Röhrchen bei –70°C gelagert.

## 3.2 Kultivierung und Transformation von *Solanum tuberosum*

### 3.2.1 Sterilkultur von *Solanum tuberosum*

Die Stengel der Pflanzen wurden mit dem Skalpell jeweils über den Achselknospen durchtrennt und von den Blättern befreit. Die entstandenen Segmente wurden mit der physiologischen Unterseite nach unten auf MS-Medium in Weckgläser gesetzt und bei 21°C bzw. 18°C und 16 h Belichtung und einer Lichtintensität von 15.000 Lux kultiviert.

### 3.2.2 Erdkultur von *Solanum tuberosum*

Für das Auspflanzen von *in vitro*-Kulturen ins Gewächshaus wurden ca. 3 Wochen alte bewurzelte Stecklinge verwendet. Die Pflanzen wurden in 9 cm-Töpfe mit handelsüblicher Pflanzerde gesetzt. In den ersten zwei Tagen wurden die Pflanzen mit einer Haube abgedeckt, um die Anpassung an die Gewächshausbedingungen zu erleichtern. Die Kultivierung erfolgte unter Langtagbedingungen.

### 3.2.3 Protoplastierung

Für die Protoplastierung nach Saalbach *et al.* (1996) wurden ca. 6 Wochen alte *in vitro*-Pflanzen verwendet. Diese wurden, zum Abbau von Stärke in den Mesophyllzellen, für 2 Tage bei 4°C dunkel präinkubiert. Nach dem Entfernen der Leitbahnen wurden die Blätter in Stücke mit ca. 5 mm Kantenlänge geschnitten. Diese wurden in 9 cm Petrischalen mit der Unterseite nach unten auf die Enzymlösung gelegt und anschließend über Nacht dunkel bei 24°C inkubiert. Die Lösung wurde in einem ersten Reinigungsschritt über eine Nylonmembran mit 0,45 µm Porengröße filtriert und das Filtrat in Plastikröhrchen überführt. Durch die anschließende Zentrifugation für 5 min bei 600 rpm wurden intakte Protoplasten im entstehenden Pellet angereichert. Die nachfolgenden zwei Waschschrte mit 0,5 M Glycinlösung erfolgten jeweils für 5 min bei 600 rpm. Das gereinigte Pellet wurde in Mannit-Lösung aufgenommen und ein Aliquot der suspendierten Zellen in einer Thoma-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Aliquots von jeweils 500.000 Protoplasten wurden zentrifugiert und das Pellet in 240 µl Mannitlösung resuspendiert. Bis zur Transformation verblieben die Zellen auf Eis.

#### Lösungen:

##### Enzymlösung

für 400 ml:

600 mg Cellulase Onozuka R-10

200 mg Driselase

96 mg Macerozym R-10

in 0,5 M Glycin, pH 5,8

##### Glycinlösung

0,5 M Glycin

pH 5,6-5,8 (mit KOH)

##### Mannitlösung

0,5 M Mannit

0,1 mM CaCl<sub>2</sub>

pH 5,6



### 3.2.4 Elektroporation von Protoplasten

Die Elektroporation ist eine Methode des direkten DNA-Transfers in lebende Zellen. Durch kurze elektrische Impulse werden Zellmembranen vorübergehend permeabilisiert, ohne zerstört zu werden. Die Elektroporation wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Saalbach *et al.* (1996) durchgeführt.

Es wurden Küvetten mit 4 mm Elektrodenabstand verwendet. Diese wurden auf Eis vorgekühlt.

Die vorbereitete DNA wurde mit Mannitlösung auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA zu 240 µl Protoplastensuspension gegeben und vorsichtig gemischt. Das Gemisch wurde unverzüglich in vorgekühlte Küvetten überführt und elektroporiert.

Dabei wurden am BIO-RAD-Elektroporator folgende Parameter eingestellt:

<i>Resistance</i>	100 Ω
<i>Set Volts</i>	180 mV
<i>Capacity</i>	125 µF

Nach der Elektroporation wurde die Protoplastensuspension sofort aus der Küvette entnommen und in ein 12 ml-Reaktionsgefäß überführt.

### 3.2.5 Protoplastenkultur in Alginatkugeln

Die Protoplastenkultur in Alginat wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Herrmann *et al.* (1990) durchgeführt.

Die Protoplasten wurden nach der Transformation durch Zugabe von SKM-Medium auf eine Zelldichte von 40.000 Zellen pro Milliliter eingestellt. Diese Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit der Alginatlösung vorsichtig gemischt. Das Alginatgemisch wurde in eiskalte 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung getropft. Dabei polymerisierten Kugeln von ca. 5 mm Durchmesser. Als Kulturgefäße wurden Petrischalen mit 3,5 cm Durchmesser verwendet. Nach zwei Stunden Inkubation bei 4°C wurde die 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegen eine 10 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung ausgetauscht. Danach wurden die Gefäße für zwei Tage im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Zur weiteren Kultur wurde die CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegen SKM-Medium ausgetauscht und die Protoplasten im Dunkeln bei 20-22°C inkubiert. Nach frühestens 10 Tagen begannen sich die Protoplasten zu teilen. Nach weiteren 3 Wochen waren die entstandenen Mikrokalli mit bloßem Auge in den Alginatkugeln sichtbar.

#### Lösungen:

##### Alginatlösung

2,8 % Alginsäure Na-Salz

0,4 M Mannit

##### CaCl<sub>2</sub>-Lösungen

a)	50 mM CaCl <sub>2</sub>	b)	10 mM CaCl <sub>2</sub>
	0,4 M Mannit		0,4 M Mannit

### 3.2.6 Befreiung von Mikrokalli aus Alginatkugeln und Regeneration

Nachdem in den Alginatkugeln Mikrokalli mit einem Durchmesser von ca. 0,5-0,7 mm sichtbar waren, wurden die entsprechenden Kugeln mit der Pinzette herausgenommen und in eine Petrischale mit Citratlösung überführt. Während der folgenden zwei- bis vierstündigen Inkubation auf dem Schüttler (700 rpm) depolymerisierte das Alginat und die Kugeln lösten sich auf. Die befreiten Mikrokalli wurden mit der Pinzette auf Petrischalen mit SKM-Festmedium überführt und mit 1 ml SKM-Flüssigmedium beträufelt. Danach wurden die Platten für ca. eine Woche bei 22°C im Dunkeln kultiviert und anschließend schrittweise der vollen Beleuchtung im Pflanzenwuchsschrank ausgesetzt. Sobald stecknadelkopfgroße Kalli vorlagen, wurden diese auf Platten mit RJM-Medium überführt. Nach dem Ergrünen der Kalli erfolgte die Selektion auf Platten mit RJM-Medium und 1,5 µg/µl Phosphinothricin. Etwa 2 Wochen wurde bis zum Einsetzen der Selektion weiterkultiviert. Die grünen transgenen Kalli wurden zur Förderung der Regeneration auf frisches RJM-Medium umgesetzt. Regenerierende Sprosse wurden bei einer Größe von 5-8 mm mit dem Skalpell abgetrennt und auf MS-Medium bewurzelt.

#### Lösungen:

##### Citratlösung

20 mM Na<sub>3</sub>-Citrat

0,4 M Mannit

pH 7,4

### 3.3 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Solanum tuberosum*

#### 3.3.1 Anzucht der Agrobakterien

Für die Kartoffeltransformation wurde eine frische Agrobakterienkultur verwendet. Dafür wurde eine Agrobakterienkolonie von der Platte in 5 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft. Diese wurde ÜN bei 28°C auf einem Schüttel-Inkubator kultiviert. Diese Starterkultur diente zum Animpfen der Hauptkultur in 200 ml YEB-Medium mit Acetosyringon. Nach einer weiteren ÜN Kultivierung im Schüttel-Inkubator bei 28°C erreichte die Messung der OD<sub>600</sub> am Vormittag des Folgetages einen Wert zwischen 0,7 und 0,9. Die ÜN-Kultur wurde dann in einem Zentrifugenbecher bei 4000 rpm und 21°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml MS<sub>30</sub>-Flüssigmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde es in 100 ml MS<sub>30</sub>-Flüssigmedium aufgenommen und in ein Weckglas überführt.

#### 3.3.2 Transformation der Explantate

Zur Infektion wurden Internodien von ca. 4-6 Wochen alten Pflanzen aus *in vitro*-Kultur geschnitten und in die Suspension gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30-60 min im Dunkeln. Die Internodien wurden mit Hilfe eines Teesiebes aus der Suspension gefischt und auf autoklaviertem Haushaltspapier kurz abgetropft. Zur Co-Kultivierung wurden sie auf Platten mit MS<sub>30</sub>-Festmedium ausgelegt. Diese Platten wurden nicht mit Parafilm verschlossen, sondern in Klarsichtboxen für zwei Tage bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Co-Kultivierung war auf den Explantaten und um diese herum eine weißliche Schicht von Agrobakterienbewuchs sichtbar. Um diese Bakterienkultur zu entfernen,

wurden die Internodien dreimal nacheinander in MS<sub>30</sub>-Medium mit Ticarcillin gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden sie auf sterilem Papier kurz abgetropft und anschließend auf MI-Medium ausgelegt. Diese Platten wurden wiederum in Klarsichtboxen gestellt.

### 3.3.3 Regeneration transgener Sprosse

Der erste Kallusinduktionsschritt der Internodien erfolgte für 2 Wochen bei 21°C und 16 h Licht. Nach einer zweiwöchigen Inkubation auf MII-Medium wurden die Internodien auf das Sproßregenerationsmedium MIII überführt. Die Inkubation erfolgte weiterhin bei 21°C und 16 h Licht. Ein 14-tägiger Medienwechsel wurde durchgeführt. Die regenerierenden Sprosse wurden abgenommen und auf selektivem MS-Medium mit Ticarcillin zur Bewurzelung gebracht.

#### MS<sub>30</sub>-Flüssigmedium

4,4 g/l MS-Komplettmedium (Duchefa)  
30 g/l Glucose  
pH 5,8 (mit KOH)

<u>MI-Medium</u>	<u>MII-Medium</u>	<u>MIII-Medium</u>
4 mg/l Zeatinribosid	4 mg/l Zeatinribosid	4 mg/l Zeatinribosid
0,16 mg/l NAA	—	3,5 mg/l GA <sub>3</sub>
500 mg/l Ticarcillin	500 mg/l Ticarcillin	500 mg/l Ticarcillin
50 mg/l Kanamycin bzw.	50 mg/l Kanamycin bzw.	50 mg/l Kanamycin bzw.
2,5 mg/l PPT	2,5 mg/l PPT	2,5 mg/l PPT
pH 5,8 (mit KOH)	pH 5,8 (mit KOH)	pH 5,8 (mit KOH)

## 3.4 Kultivierung und Transformation von *Arabidopsis thaliana*

### 3.4.1 Kultivierung

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Erdkultur erfolgte in einem Gemisch aus einem Teil Vermiculit, einem Teil Sand und zwei Teilen Erde. Um Pflanzen für die Transformation heranzuziehen, wurde in 8 x 8-cm-Töpfe ausgesät, deren Oberflächen mit einem Kunststoffnetz überzogen waren. Pro Topf wurden die 5 kräftigsten Sämlinge belassen. Die Kultivierung zur Gewinnung kräftiger Pflanzen mit viel Blattmaterial erfolgte unter Kurztagbedingungen (7 h Licht) bei 20°C im Pflanzenwuchsschrank. Zur Blühinduktion vor der Transformation wurden die Pflanzen Langtagbedingungen im Gewächshaus ausgesetzt.

### 3.4.2 Transformation

Die Transformation wurde nach der *floral dip*-Methode (mod. nach Clough und Bent, 1998) durchgeführt. Dafür wurden blühinduzierte Pflanzen benötigt. Die ersten Blütenstände wurden zurückgeschnitten, um dadurch eine verstärkte Bildung neuer Blütenstände zu bewirken, die nach 5-7 Tagen transformiert werden konnten. Ziel der *floral dip*-Methode ist die Transformation unreifer Samenanlagen. Dazu wurden die jungen Blütenstände mit einer großen Anzahl von Agrobakterien infiziert. Die dabei in einigen Fällen übertragene T-DNA führte dann zu ca. 0,1-1 % transgenen Samen.

Das folgende Protokoll bezieht sich auf die Transformation von etwa 20 Pflanztopfen mit einem Agrobakterienklon.

Zwei Tage vor der Transformation wurde abends eine 10 ml-ÜN-Kultur des gewünschten Agrobakterienklons in YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika gestartet.

Einen Tag vor der Transformation wurden jeweils 300 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in 1 l-Kolben mit jeweils 3 ml der ÜN-Kultur inokuliert.

Am Transformationstag wurden die Kulturen bei 5000 rpm für 15 min in Zentrifugenbechern pelletiert und anschließend alle Pellets zusammen in 1 l Infiltrationsmedium (mod. nach Bechtold *et al.*, 1998) resuspendiert (OD<sub>600</sub> ca. 0,8). Ein Aliquot von 200 ml konnte bis zu viermal für Transformationen verwendet werden. Für die eigentliche Transformation wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen kopfüber in ein 400 ml-Becherglas mit 200 ml Infiltrationskultur gehängt. Als Halterung diente ein Metallstab. Nach etwa 5 min wurden die Töpfe aus dem Becherglas genommen und in eine Plastikschaale mit Abdeckhaube gelegt. Nach etwa drei Tagen können die Töpfe aufgestellt und wieder gegossen werden. Auch die Haube wurde jetzt abgenommen. Als die ersten Blütenansätze zu sehen waren, wurde jede Pflanze einzeln in lichtdurchlässige Tüten eingepackt, um Kreuzbefruchtungen zu vermeiden.

Nach etwa 3-4 Wochen Wachstum konnten die Samen geerntet werden. Vor dem erneuten Aussäen wurden die Samen einige Tage im Kühlschrank vernalisiert.

#### Infiltrationsmedium

1 x	MS-Medium mit Gamborg Vitaminen
5 %	Saccharose (w/v)
0,05 %	MES
40 nM	BAP
0,005 %	Triton
pH	5,7 mit KOH

### 3.4.3 Selektion positiver Transformanden

Die Samen wurden durch zweiminütiges Waschen in 70 % Ethanol und anschließende 45-minütige Behandlung mit 5 % Natriumhypochlorid und 1 % SDS oberflächensterilisiert. Die Samen wurden anschließend auf MS-Medium mit 0,5 % Saccharose und dem entsprechenden Selektionsagens ausgebracht. Das gleichmäßige Verteilen der Samen gelang durch Verwendung von 0,1 % Agar-Lösung. Die Platten wurden Kurztagsbedingungen ausgesetzt. Resistente Sämlinge konnten nach etwa 14 Tagen in normale Erde übertragen werden.

### 3.5 Arbeiten mit DNA

#### 3.5.1 Plasmidpräparationen aus *E. coli*

Die Art der Plasmidpräparation richtetete sich nach der benötigten DNA-Menge. Für die schnelle Identifizierung von Klonen nach Ligationen und Transformationen wurden Minipräparationen modifiziert nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Für die Minipräparation wurden 3 ml Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und wie unter 3.1.1 beschrieben über Nacht angezogen. Die Aufarbeitung erfolgte in sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäßen. Die Zentrifugationen wurden in der Eppendorfszentrifuge bei 12.000 g durchgeführt.

Von den gewachsenen Flüssigkulturen wurden je 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lsg. I resuspendiert. Dazu wurden 200 µl Lsg. II gegeben, gut gemischt und 2-3 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lsg. III wurde nochmals 2-3 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert. Nach der Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 450 µl Isopropanol gefällt. Anschließend folgte ein weiterer 10-minütiger Zentrifugationsschritt. Das DNA-Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und zum Fällern von Proteinen mit 50 µl 7,5 M Ammoniumacetatlösung versetzt. Nach 20 min auf Eis wurde die Probe 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol wurde die DNA gefällt und anschließend pelletiert. Das Pellet wurde in 20 – 40 µl TE-Puffer aufgenommen und die DNA-Konzentration durch Messung im Photometer bestimmt.

#### Lösungen:

##### Lösung I

25 mM Tris (pH 8,0)

10 mM EDTA

##### Lösung II

0,2 N NaOH

1 % SDS

##### Lösung III

3 M Kaliumacetat (pH 4,8)

##### TE (pH 8,0)

1 mM EDTA

10 mM Tris (pH 8,0)

Zur Gewinnung von DNA-Mengen bis zu 60 µg mit dem Nucleospin® Plasmid System der Firma Macherey&Nagel wurde ein *E.coli* Kulturvolumen von 5 ml aufgearbeitet. Für die Gewinnung von DNA-Mengen größer als 100 µg mit dem Nucleobond® AX System von Macherey&Nagel war ein Kulturvolumen von ca. 50 ml erforderlich. In beiden Fällen wurde eine gut gewachsene Übernacht-Kultur abzentrifugiert und das so gewonnene Zellpellet mit Hilfe denaturierender Puffer lysiert. Nach einer Klärung des Lysates mittels Zentrifugation erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Silica-Membran-Säule. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, bei Anwesenheit kaotroper Salze und bei saurem pH-Milieu an Silikate zu binden. Im Bereich unter pH 7,5 werden etwa 95 % der DNA an die Silica-Membran adsorbiert, im alkalischen Bereich und bei niedrigen Salzkonzentrationen löst sich die DNA wieder von der Membran ab. Diese unterschiedliche Affinität wurde unter Verwendung entsprechender Puffer ausgenützt. Die auf diese Weise präparierte DNA konnte aufgrund ihres hohen Reinheitsgrades für die Transformation von Protoplasten eingesetzt werden.

### 3.5.2 Plasmidpräparationen aus *Agrobacterium tumefaciens*

Benötigt wurde eine gut gewachsene ÜN-Kultur. Aus dieser Kultur wurden 1,5 ml entnommen und 30 sec bei 12.000 rpm und RT in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II und einer weiteren 10-minütigen Inkubation der Probe bei RT wurden 30 µl Phenol (equilibriert mit Lösung II) und 150 µl Lösung III zugegeben. Dieses Gemisch wurde für 15 min bei –20°C aufbewahrt. Nach der anschließenden Zentrifugation für 5 min bei 12.000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Ethanol und 10-minütiger Zentrifugation (s.o.) am Boden des Gefäßes pelletiert. Dieses Pellet wurde nun in 300 µl Lösung IV resuspendiert und anschließend wieder mit 1 ml eiskaltem Ethanol und 5-minütiger Zentrifugation gefällt. Nach einer Waschung des Pellets mit 70 % Ethanol konnte die DNA mit Hilfe einer *speedvac* getrocknet und anschließend in 20 µl TE gelöst werden. Für eine Restriktionsspaltung zur Überprüfung des Plasmids wurden ca. 5 µl der DNA-Lösung eingesetzt.

Lösung I  
25 mM Tris  
10 mM EDTA  
4 mg/ml Lysozym  
pH 8,0

Lösung II  
0,2N NaOH  
1 % SDS

Lösung III  
3 M Kaliumacetat  
pH 4,8

Lösung IV  
0,1 M NaOAc  
50 mM Tris  
pH 8,0

### 3.5.3 Reinigung von DNA-Lösungen

Zur Reinigung von DNA-Lösungen nach enzymatischen Spaltungen, Dephosphorylierungen und PCRs wurde das kommerzielle System Nucleospin<sup>®</sup> ExtractII der Firma Macherey & Nagel verwendet. Das Prinzip besteht dabei aus einer spezifischen Bindung von DNA bestimmter Größen an eine Silica-Säulenmatrix und nachfolgenden Waschschritten. Dabei werden sowohl Proteine als auch dNTPs und störende Puffersalze entfernt. Durch einen Elutionspuffer wird die gereinigte DNA wieder von der Matrix gelöst.

Die so aufgereinigte DNA kann sowohl für anschließende Klonierungen als auch für die Sequenzierung verwendet werden.

Zur Konzentrierung oder zum Umpuffern wurde die DNA durch Zugabe von 3 M Na-Acetat (Endkonzentration von 0,3 M) und 2,5 Volumen reinem Ethanol bzw. 1 Volumen Isopropanol gefällt. Die Fällung erfolgte für 20 min auf Eis. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 12.000 g zentrifugiert, mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde im erforderlichen Volumen TE-Puffer resuspendiert und für die vorgesehenen Zwecke verwendet. Die Lagerung von DNA-Proben erfolgte bei –20°C.

### 3.5.4 Elektrophorese von DNA im Agarosegel

Die Auftrennung der DNA erfolgte je nach Molekulargewicht in 0,7-1,5 % Agarosegelen (w/w) in TAE-Puffer. Die Agarose wurde in TAE-Puffer bei 100°C gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 55°C wurde Ethidiumbromid (400 µg/l) zugegeben und die Lösung in einen Gelträger gegossen. Vor dem Auftragen der DNA wurde diese mit 1/10 Volumen Probenpuffer gemischt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 1-5 V/cm Elektrodenabstand. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde Marker-DNA, die Fragmente bekannter Größe enthielt, mit auf das Gel aufgetragen. Nach dem Ende des Laufes wurden die DNA-Banden mit Hilfe eines UV-Transilluminators (254 nm) durch die Fluoreszenz des in die DNA eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht. Die Gele konnten mit Hilfe eines Videoprintgerätes dokumentiert werden.

#### Lösungen:

##### 50 x TAE-Puffer

242 g Tris  
57,1 ml Eisessig  
100 ml EDTA 0,5 mM, pH 8,0  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

##### Laufpuffer (1 x TAE)

20 ml 50 x TAE  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

##### Gelpuffer

1 x TAE mit 40 µl/l Ethidiumbromid-SL

### 3.5.5 Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Die Elution von DNA aus dem Agarosegel diente der Gewinnung spezifischer Fragmente zur weiteren Verwendung z.B. für Ligationen. Dafür wurde je nach Bedarf eine größere Menge DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen gespalten und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Gelbereich mit den gewünschten DNA-Fragmenten wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm auf dem UV-Transilluminator herausgeschnitten und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Elution erfolgte mit Nucleospin® ExtractII von Macherey & Nagel. Durch Zugabe eines Lysis-Puffers und Inkubation bei 50°C wurde die Agarose verflüssigt. Anschließend wurde die DNA aus der Lösung über eine Silica-Membran Säule aufgereinigt. Die in Elutionspuffer oder sterilem Wasser gelöste DNA konnte sofort weiterverwendet oder bei –20°C gelagert werden.

### 3.5.6 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

#### Photometrische Messung

Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Verdünnung der zu messenden DNA in einem Volumen von 50 µl oder 100 µl hergestellt. Im UV-Photometer wurde die optische Dichte im Spektralbereich von 230 – 320 nm gemessen. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Das Verhältnis der OD bei den drei Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm sollte 1:2:1 betragen. Ein Verhältnis der OD bei 260 nm und 280 nm von < 1,8 deutet auf eine Verunreinigung durch Proteine bzw. Phenol hin.

### 3.5.7 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Zur enzymatischen Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet und die angegebenen Reaktionsbedingungen eingehalten. Analytische Spaltungen wurden in 10 oder 20 µl Volumen mit 1-10 Enzymeinheiten pro µg DNA für 1-3 Stunden bei 37°C durchgeführt. Für präparative Zwecke wurde der Ansatz entsprechend vergrößert. Enzymatische Spaltungen mit zwei Enzymen wurden, wenn möglich, gleichzeitig im für beide Enzyme passenden Puffer durchgeführt. Alternativ musste nacheinander im jeweils optimalen Puffer gespalten werden.

### 3.5.8 Dephosphorylierung von einzelsträngigen DNA-Enden

Um Religationen des linearisierten Vektors zu verhindern, wurde dieser mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dabei wurden an den Enden die Phosphatgruppen abgespalten, die für eine Ligation benötigt wurden. Der Vektor konnte dann nur noch durch den Einbau von Fremd-DNA ligiert werden, die die terminalen Phosphatgruppen besaß.

Ansatz (20 µl Gesamtvolumen):

- 1 µl alkalische Phosphatase (1 U/µl)
- 2 µl Dephosphorylierungspuffer
- 10 µl geschnittene DNA (ca. 1 µg)
- 6 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C und anschließend zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase 10 min bei 68°C inkubiert.

### 3.5.9 Ligation

DNA-Moleküle mit komplementären Einzelstrang-Enden oder glatten Enden wurden mit T4-Ligase verknüpft. Für die Ligation wurden aus Agarose-Gelen isolierte DNA-Fragmente mit der Vektor-DNA im Verhältnis 3:1 (ca. 200 ng pro Unit T4-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 2 h bei Raumtemperatur im mitgelieferten Reaktionspuffer.

### 3.5.10 Elektroporation von *E. coli*

Bei der Elektroporation werden die Zellmembranen kompetenter Bakterien (s. 3.1.2) mit Hilfe kurzer elektrischer Impulse hoher Feldstärke vorübergehend für größere Moleküle wie z.B. Plasmide durchlässig gemacht. Die Struktur der Membran wird dabei nicht irreversibel zerstört.

Die kompetenten Zellen wurden vorsichtig aufgetaut. Die für die Elektroporation benötigten 2 mm-Küvetten wurden auf Eis vorgekühlt. Zu 40 µl kompetenten Zellen wurden 1-3 µl der zu transformierenden DNA gegeben. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Küvette überführt und wie folgt elektroporiert:



Spannung: 2,5 kV  
Widerstand: 200  $\Omega$   
Kapazität: 25  $\mu$ F

Anschließend wurde 1 ml SOB-Medium zugegeben und die Suspension mit einer Pasteurpipette in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Kultur wurde etwa 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden Aliquots des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

### **3.6 Gewinnung von Nukleinsäuren aus pflanzlichen Geweben**

#### **3.6.1 Isolierung von DNA aus pflanzlichen Geweben**

Um für den PCR-Nachweis kleine Mengen DNA aus pflanzlichen Geweben zu isolieren, wurde das kommerzielle System REExtract-N-Amp<sup>®</sup> Plant PCR Kit der Firma Sigma verwendet. Für diesen Zweck war ein kleines Blattstück mit einem Durchmesser von 5 mm ausreichend. Die Extraktion erfolgte in einem 2 ml-Reaktionsgefäß durch Zugabe von 100  $\mu$ l Extraktions-Lösung und anschließender Inkubation für 10 min bei 95°C. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Verdünnungs-Lösung zu dem Ansatz pipettiert und alles gut durchmischt. Als Template für die anschließende PCR-Reaktion mit dem PCR ReadyMix wurden standardmäßig 4  $\mu$ l der DNA-Präparation eingesetzt.

Zur Isolierung größerer Mengen genomischer DNA aus pflanzlichen Geweben wurde das kommerzielle System NucleoSpin<sup>®</sup> Plant XL der Firma Macherey&Nagel verwendet. Dafür wurden bis zu 1 g frisches Blattmaterial verwendet. Die durchschnittliche Ausbeute lag zwischen 60 und 260  $\mu$ g genomischer DNA. Das frische Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend wurden die Zellen in einem Lysispuffer aufgeschlossen und die RNA durch eine Rnase-Behandlung abgebaut. Nach Aufreinigung des Lysates über eine Silica-Säule konnte die DNA in 750  $\mu$ l Elutionspuffer gelöst werden.

#### **3.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe wurde das kommerzielle System NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant von Macherey&Nagel verwendet. Aus 100 mg frischem Blattmaterial konnten damit bis zu 70  $\mu$ g RNA gewonnen werden.

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und auf eine mit einer Silica-Membran versehene Säule geladen. Nach verschiedenen Waschschritten und einer Dnase-Behandlung wurde die RNA mit 60  $\mu$ l Rnase-freiem Wasser eluiert. Die so aufgereinigte RNA konnte sofort als Template für eine RT-PCR eingesetzt oder bei -70°C gelagert werden.

### 3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Herstellung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt (Saiki *et al.*, 1988).

Mit Hilfe dieser Methode können definierte DNA-Bereiche durch Verwendung von speziellen synthetischen Oligonukleotiden (*Primern*) gezielt vervielfältigt werden. Deren Sequenz ist so gestaltet, dass sie sich an den Enden des Abschnittes der vorgegebenen DNA (*Template*) anlagern. Zur Vervielfältigung wird eine hitzestabile DNA-Polymerase eingesetzt, die den Gegenstrang einzelsträngiger, denaturierter Template-DNA synthetisiert. Bei geeigneter Temperatur wird die Anlagerung der Primer ermöglicht und die Polymerase kann den Gegenstrang neu synthetisieren. Die für die Neusynthese notwendigen dNTPs werden, wie alle anderen Reagenzien, in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt, und allein durch die Wahl der Temperatur können die einzelnen Reaktionsschritte gesteuert werden: Durch Erhitzen wird die Template-DNA denaturiert, durch ein leichtes Absenken der Temperatur wird eine Anlagerung der Primer ermöglicht und anschließend erfolgt die Neusynthese bei einer für die Polymerase optimalen Temperatur. Durch Wiederholung dieser drei Temperaturschritte (Zyklus) kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der Kopienzahl des gewünschten DNA-Abschnittes.

Durch die Verwendung mutierter Primer ist die Modifizierung von PCR-Produkten möglich. Die Konzentration der eingesetzten Substanzen, die Höhe der Temperatur und die Dauer der verschiedenen Abschnitte sind von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz, dem GC-Gehalt der Primer und anderen Faktoren abhängig.

Im Allgemeinen wurde die PCR in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit 400 nM Primer, 200 µM dNTPs und 2 U Taq-Polymerase in einem PCR-Puffer (20 mM TrisHCl, pH 8,5; 16 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>) durchgeführt. Die Zyklenzahl richtete sich nach dem Ziel des Experiments und nach der Art der Template-DNA. Sie lag meist zwischen 30 und 35 Zyklen.

### 3.8 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um die Expression eingebrachter Transgene spezifisch überprüfen zu können. Im Unterschied zum ebenfalls möglichen Northern-Blot wurde für diese Methode nur eine sehr kleine Menge RNA benötigt. In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) unter Verwendung spezifischer Primer ein cDNA-Transkript der zu untersuchenden mRNA erzeugt. In einem zweiten Schritt diente diese cDNA als Template für eine konventionelle PCR. Das Versuchsergebnis zeigte, ob das untersuchte Gen in der analysierten Pflanze exprimiert wurde, oder nicht. Durch den Einsatz gleicher Mengen hochreiner RNA ohne inhibierende Substanzen aus dem Pflanzenmaterial waren vergleichende Aussagen über die Expressionsniveaus des Transgens in verschiedenen Pflanzenlinien möglich.

Für die Versuche wurde das kommerzielle System SuperScript™ One-Step RT-PCR mit Platinum® Taq von Invitrogen verwendet. Als Template wurden 100 ng RNA eingesetzt. Es wurde die im Standardpuffer eingestellte Mg-Konzentration von 1,2 mM und dNTP-Konzentration von 200 µM beibehalten.

Die RT-PCR lief unter folgenden Bedingungen ab:

50°C	30 min	<b>Reverse Transkription</b>
94°C	2 min	
94°C	45 sec	<b>PCR, 40 Zyklen</b>
55°C	45 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
8°C	∞	

Als Primer für die cDNA-Synthese diente 3'GFP (im Fall des gfp-Gens) bzw. 3'BAR (im Fall des bar-Gens).

Um eine Kontamination der RNA durch DNA zu überprüfen, wurden Proben ohne vorherige cDNA-Synthese mitgeführt. Amplifizierungsprodukte in diesen Proben würden auf eine Verunreinigung der Proben durch DNA hinweisen.

### 3.9 Triplehelix-spezifische Methoden

#### 3.9.1 Design von Triplehelix-Oligonukleotiden

Es werden zwei Typen von Oligonukleotiden unterschieden, die mit der doppelsträngigen Zielgenesequenz eine Triplehelix ausbilden können. Diese Oligonukleotide bestehen entweder nur aus Purinen oder aus Pyrimidinen. Da Oligonukleotide vom Pyrimidin-Typ stärkere Wechselwirkungen mit der Zielgenesequenz eingehen und damit stabilere Triplehelices ausbilden, wurden ausschließlich Oligonukleotide dieses Typs eingesetzt. Zur Verbesserung der Bindungseigenschaften wurde anstelle der normalen Cytosin-Basen 5-methyl-Cytosin verwendet. Ein Teil der verwendeten Oligonukleotide wurde zum Schutz vor 3'-Exonukleasen durch Verwendung von zwei Phosphorothioat-Bindungen am 3'-Terminus modifiziert.

Endmodifizierungen mit Psoralen wurden vorgenommen, um UVA-induzierte kovalente Bindungen des Triplehelix-Oligonukleotids zu ermöglichen. Aus Synthesegründen wurde das Psoralen über einen C6-*Linker* an das Oligonukleotid gebunden.

Für den Nachweis von Triplehelices mittels magnetischer Separation wurden die 3'-Enden der Oligonukleotide mit Biotin modifiziert. Das erlaubt eine Bindung des Biotins an streptavidinbeschichtete magnetische Kügelchen (Streptavidinbeads).

Für die Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop wurden Oligonukleotide mit fluoreszierenden Molekülen gekoppelt. Anfangs wurde Rhodamin verwendet, das sein Anregungsmaximum zwischen 540 und 560 nm und die maximale Emission bei 580 nm hat. Da dieser Fluoreszenzmarker im aktuellen Programm von Sigma nicht mehr enthalten war, wurde für die weiteren Versuche das verbesserte Fluoreszenzmolekül TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) anstelle von Rhodamin verwendet. Die spektralen Eigenschaften der beiden Moleküle sind vergleichbar.

### 3.9.2 Hybridisierung von Triplehelix-Oligonukleotiden und Ziel-DNA *in vitro*

Vor dem Beginn der eigentlichen Hybridisierung wurde aus den beiden komplementären einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden die doppelsträngige Ziel-DNA erstellt. Dazu wurden jeweils 1,4 µl einer 10 µM Oligonukleotidlösung, 50 µl doppelt konzentrierter Hybridisierungspuffer (Perkins *et al.*, 1998) und 44 µl H<sub>2</sub>O in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Die Inkubation erfolgte jeweils ca. 3 min bei 95°C, 50°C und RT. Der so erstellte DNA-Doppelstrang konnte als Ziel-DNA für die Triplehelix-Oligonukleotide eingesetzt werden.

Die eigentlichen *in vitro*-Hybridisierungen zur Ausbildung der Triplehelices wurden durch Zugabe des jeweiligen Triplehelix-bildenden Oligonukleotids eingeleitet. Pro Versuch wurden zu jedem DNA-Doppelstrang-Ansatz 3,2 µl einer 100 µM Lösung eines Triplehelix-bildenden Oligonukleotids zugegeben. Die Dauer der Inkubation variierte zwischen 2 h und 72 h. Die Inkubationstemperaturen lagen im Bereich zwischen 37°C und 21°C.

### 3.9.3 Bestrahlung mit UVA

Zielsequenzen, die ein 5'-TpA-3'-Dinukleotid enthalten, eignen sich für psoralenkonjugierte Triplehelix-bildende Oligonukleotide, die durch UVA-Strahlung quervernetzt werden können. Die Bestrahlung erfolgte im Anschluss an die Inkubation bei Raumtemperatur im UVP<sup>®</sup> Crosslinker bei einer Wellenlänge von 365 nm. Die Proben wurden bei geöffnetem Deckel für 45 min mit einer Leistung von 120 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt.

## 3.10 Triplehelix-Nachweise

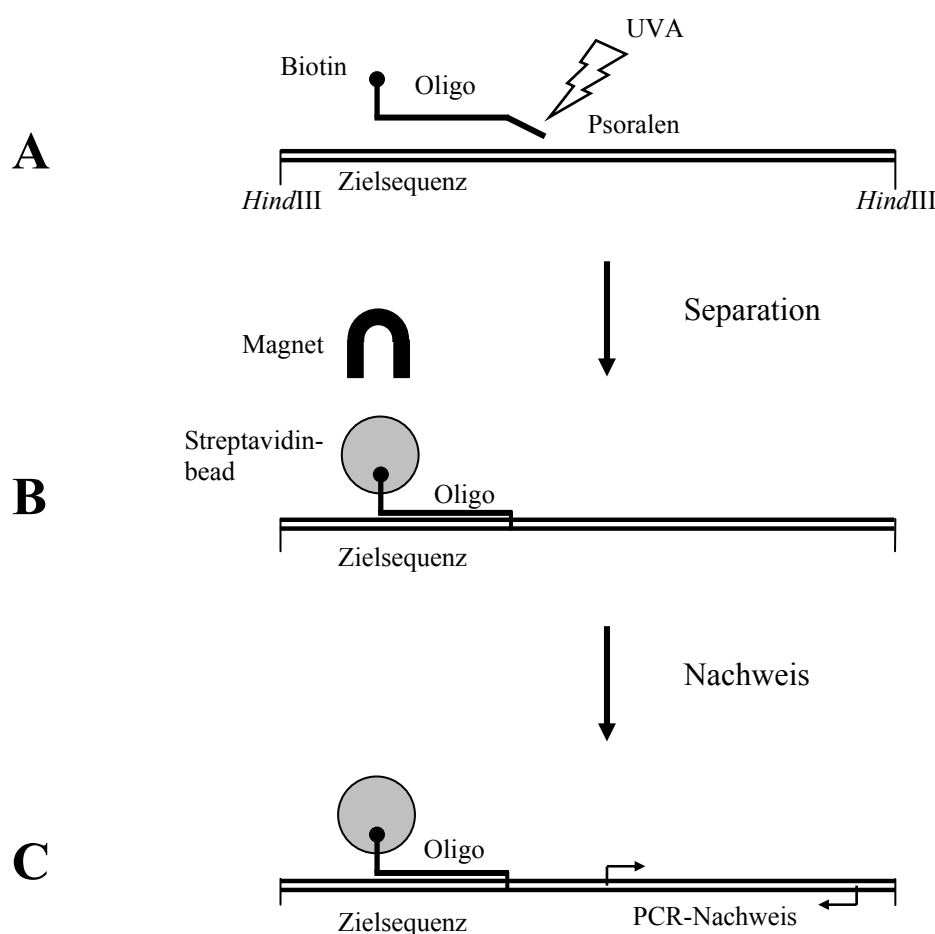
Um eine Triplehelix nachzuweisen, sind verschiedene Methoden etabliert, die bestimmte Effekte eines an seine Zielsequenz gebundenen Oligonukleotides ausnützen (Gelretardation, Hemmung von Restriktionsenzymen u.a.). Werden Psoralen-konjugierte Triplehelix-bildende Oligonukleotide eingesetzt, erweitert sich das Spektrum der Nachweismöglichkeiten aufgrund der stabilen, kovalenten Quervernetzung des Oligonukleotids mit der Zielsequenz nach UVA-Bestrahlung (z.B. magnetische Separation).

### 3.10.1 Gelretardation

Der Nachweis einer ausgebildeten Triplehelix-Struktur erfolgte durch Retardation dieses Komplexes gegenüber freier doppelsträngiger DNA in der Gelelektrophorese. Als Gelmatrix wurde das MDE<sup>®</sup>-Gelsystem der Firma Biozym verwendet. Dieses Material erlaubt den Nachweis selbst kleinster Unterschiede im Gellauf von DNA-Molekülen. Das Gel wurde 0,8 %ig verwendet. Als Laufpuffer wurde ein TrisHCl-Puffer mit 10mM MgCl<sub>2</sub> eingesetzt (Gamper *et al.*, 1998). Die Gele liefen bei einer Spannung von 110 V ca. 2,5 h. Nach der Gelelektrophorese wurde die DNA durch Färbung mit Gelstar<sup>®</sup> (Biozym) nachgewiesen.

### 3.10.2 Triplehelix-Nachweis durch magnetische Separation

Die Nachweismethode der magnetischen Separation basiert auf bifunktionellen Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden, deren eines Ende mit Psoralen und deren anderes Ende mit Biotin modifiziert wurde (s. Abb. 6A). Hat eine Triplehelixbildung stattgefunden, kann das Oligonukleotid aufgrund seiner Psoralen-Modifizierung durch UVA-Bestrahlung mit der Zielsequenz kovalent verbunden werden. Aufgrund der Biotin-Modifizierung können dann DNA-Abschnitte, an denen das Oligonukleotid gebunden hat, mit streptavidinbeschichteten magnetischen Kügelchen (Streptavidinbeads) von den übrigen DNA-Fragmenten abgetrennt werden (magnetische Separation, s. Abb. 6B). Der Nachweis der isolierten Zielsequenz erfolgt durch spezifische Amplifizierung des isolierten DNA-Fragments mittels PCR (s. Abb. 6C).



**Abb. 6: Magnetische Separation als Nachweismethode für die Ausbildung von Triplehelices.**

- A: Bindung eines modifizierten Triplehelix-bildenden Oligonukleotids an die Zielsequenz. Durch UVA-Bestrahlung des Psoralens entsteht eine kovalente Bindung zur Ziel-DNA.
- B: Bindung eines Streptavidinbeads an die Biotin-Modifizierung des Oligonukleotids. Anschließende Anreicherung gebundener Triplehelices durch magnetische Separation.
- C: Sequenzspezifischer Nachweis der isolierten DNA-Fragmente mittels PCR.

Die isolierte genomische DNA wurde mit *Hind*III geschnitten. Das Restriktionsenzym wurde so gewählt, dass die gebildete Triplehelix mit ca. 3 kb flankierender Sequenz herausgeschnitten wurde. Diese Fragmentgröße erlaubte eine Aufreinigung mittels Streptavidinbeads.

Die über eine Säule gereinigte DNA aus transgenen oder Wildtyp-Kartoffelpflanzen wurde mit den entsprechenden Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden für 2 Stunden bei 37°C und 1 Stunde bei 28°C inkubiert. Die Inkubation wurde in Hybridisierungspuffer nach Perkins *et al.* (1999) in einem Volumen von 30 µl durchgeführt. Pro Ansatz wurden 2 µg genomische DNA und 1,7 µg Oligonukleotide zusammen inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Proben für 45 min einem UVA-*crosslinking* unterzogen (s. 4.3). Nach der kovalenten Stabilisierung der gebildeten Triplehelix-Strukturen wurden diese mit Hilfe der Biotinmarkierung spezifisch aufgereinigt. Für einen Hybridisierungsansatz mit 2 µg Plasmid-DNA wurden 0,1 mg Streptavidinbeads M-280 eingesetzt. Zur Vermeidung unspezifischer DNA-Bindungen wurden die Streptavidinbeads in einem Blockingpuffer mit 5 % BSA bei 37°C für eine Stunde präinkubiert. Die Bindung zwischen der Streptavidin-Beschichtung der Beads und dem Biotin der Oligonukleotide erfolgte anschließend für 90 min bei 37°C. Nach dem Einsetzen in den magnetischen Separator MPC<sup>®</sup>-S wurde der nicht gebundene Überstand mit einer Pipette abgezogen. Die anschließende Waschung erfolgte 5-mal mit dem auf 60°C vorgewärmten Waschpuffer.

Die gereinigten Streptavidinbeads wurden in 20 µl Wasser aufgenommen. Davon dienten 10 µl als Template für einen PCR-Nachweis.

### Waschpuffer

10 mM TrisHCl (pH 7,5)  
1 mM EDTA  
2 M NaCl  
0,05 % Tween

### Blockingpuffer

10 mM TrisHCl (pH 7,5)  
1 mM EDTA  
2 M NaCl  
5 % BSA

## **3.11 Nachweis fluoreszenzmarkierter Triplehelix-bildender Oligonukleotide in Zellkernen**

Transformierte Protoplasten und Blattproben transgener Pflanzen wurden mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop betrachtet, das mit einer 100 Watt-Quecksilberdampf Lampe HBO 103 für Fluoreszenzanwendungen ausgestattet war. Folgende Filter wurden verwendet: Anregungsfilter BP 450-490, Strahlenteilerspiegel FT 510 und Bandpassfilter HQ 535/50x.

Der Transport von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden vom Cytoplasma in den Zellkern von Protoplasten kann fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden, wenn Oligonukleotide verwendet werden, die mit fluoreszierenden Molekülen konjugiert sind.

Dafür wurden frisch isolierte Kartoffel-Protoplasten mit 20 µg Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden mit Hilfe der Elektroporation transformiert. Nach der Transformation wurden die Protoplasten mit 12 ml Glycin-Lösung versetzt und abzentrifugiert. Dadurch wurden freie Oligonukleotide aus der Lösung gewaschen, die in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse einen starken unspezifischen Hintergrund bilden würden. Die Protoplasten konnten nach dem Transfer auf einen Objektträger am Konfokalen Laserscanning Mikroskop analysiert werden.

## 3.12 Western-Analyse von pflanzlichen Proteinen

### 3.12.1 Proteinextraktion aus pflanzlichem Gewebe

Zur Extraktion von Proteinen aus Pflanzen wurden pro Ansatz 100 mg Blattmaterial eingesetzt. Dieses wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß unter Zugabe von 200 µl Extraktionspuffer und Verwendung eines entsprechenden Mörsers homogenisiert. Den anschließend auf Eis gelagerten Proben wurde nun 200 µl des Probenpuffers zugegeben. Nach kurzer Abkühlung der Lösung auf  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde ein Aliquot von 15 µl abgenommen und für 2 min bei  $100^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach anschließender Rückkühlung der Probe auf Eis wurden 1-5 µl für die Gelelektrophorese eingesetzt.

#### Extraktionspuffer

0,5 M Tris-HCl  
pH 6,8

#### 4xVorratspuffer

0,25 M Tris-HCl  
10 % SDS  
pH 6,8

#### Probenpuffer

28,57 % Glycerin  
0,19 M SDS  
4,78 M Harnstoff  
3,57 ml 4xVorratspuffer (pro 10 ml)  
10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (kurz vor Gebrauch)

### 3.12.2 SDS-PAGE

Die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in der vertikalen Apparatur der Firma Hoefer Scientific Instruments durchgeführt.

Die Konzentration des Acrylamids lag abhängig vom zu untersuchenden Protein zwischen 10 % und 14 %. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei einer Spannung von 80 V und anschließend für 90 min bei 120 V. Als Molekularmassenstandard wurde der *Prestained Protein Ladder* (MBI Fermentas) verwendet.

#### SDS-Laufpuffer

0,025 M Tris  
0,192 M Glycin  
0,1 % SDS

### 3.12.3 Immunoblot Analyse

Der Transfer von Proteinen erfolgte mit Hilfe der Semidry-Blottingapparatur (PerfectBlue™ Elektrobloetter™ Sedec M, Peqlab) auf Membranen aus PVDF (Hybond™-P, Amersham).

Vor dem Blot wurde die Membran in etwa 3 ml Methanol equilibriert und anschließend kurz in Transferpuffer gelegt. Das Blotten erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 3 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche. Nach dem Blotten wurden unspezifische Bindungsstellen durch ÜN-Inkubation der Membran in TBS-Puffer mit 0,1 % Tween und 5 % BSA abgesättigt.

### TBS-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,4  
0,5 M NaCl

### **3.12.4 Immunologischer Nachweis**

Vor der Hybridisierung mit dem ersten Antikörper (Anti-GFP aus Maus) wurde die Membran dreimal für 10 min gewaschen (Waschpuffer). Der Antikörper wurde 1:1.000 in TBS mit 0,1 % Tween und 2,5 % BSA verdünnt und für 90 min bei 21°C mit der Membran hybridisiert. Danach wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen in TBS mit 0,1 % Tween entfernt. Der Zweit-Antikörper (Anti-Maus aus Kaninchen gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) wurde in einer 1:500 Verdünnung für 90 min mit der Membran inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit TBS und 0,1 % Tween wurde die Membran einmal mit TBS ohne Tween abgespült und war nun bereit für die Nachweisreaktion mit dem Substratpuffer. Die Nachweisreaktion wurde bei ausreichend guter Färbung der markierten Banden nach etwa 3-10 min durch Überführen der Membran in Stoppuffer beendet.

### Substratpuffer

10 ml TBS  
66 µl NBT  
33 µl BCIP

### Stoppuffer

20 mM Tris-HCl  
5 mM EDTA  
pH 7,5

### **3.13 PAT-ELISA - Test**

Zum Nachweis des BAR - Proteins wurde der PAT-ELISA-Test der Firma Steffens (Ebringen) verwendet. Der im Test verwendete Antikörper ist eigentlich gegen das PAT-Protein gerichtet, aber aufgrund einer Kreuzreaktion ist er auch für den Nachweis des BAR-Proteins geeignet. Quantitative Aussagen über das in den Proben enthaltene BAR-Protein lassen sich damit allerdings nicht machen. Für den Test wurden 500 mg Blattmaterial von jungen Pflanzen aus dem Gewächshaus in einem Mörser auf Eis homogenisiert. Die Proben wurden mit dem entsprechenden Verdünnungspuffer 1:5 verdünnt. Anschließend wurden sie zweimal für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Mit 100 µl Überstand wurde der ELISA-Test nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Färbung wurde nach einer 30-minütigen Inkubation mit dem Substrat bei 625 nm photometrisch gemessen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Das Modellgen

Das Modellgen sollte die Möglichkeit bieten, erfolgreiche Sequenzveränderungen in modifizierten Zellen effizient detektieren zu können. Als Markergene wurden deshalb verschiedene Varianten des *green fluorescent protein* (gfp) von Reichel *et al.* (1996), Siemering *et al.* (1997) und Jach (pers. Mitteilung) sowie das Bialaphosresistenzgen (bar) von Hausmann u. Töpfer (1999) verwendet. Diese wurden als transkriptionelle Fusionen der offenen Leserahmen des gfp- bzw. bar-Gens mit einer stromaufwärts gelegenen Sequenz eines Kartoffel-Gens erstellt. Zwischen den beiden Sequenzen wurde ein Stop-Codon eingefügt, wodurch das Modellgen in seinem Ausgangszustand inaktiv war. Durch die sequenzspezifische Modifizierung des Stop-Codons *in situ* sollte dessen Umwandlung in ein Sinn-Codon erfolgen und dadurch die Aktivierung des Modellgens bewirkt werden.

Das verwendete Kartoffel-Gen codiert für die *granule bound starch synthase I* (gbssI). Es enthält einen Polypurinstrang, der die Bildung von Triplehelices ermöglicht. Allerdings befinden sich in der natürlichen Sequenz dieses Polypurinstranges zwei Pyrimidinbasen. Da für diese Unterbrechung in der Polypurinsequenz die Verwendung von modifizierten Basenanaloga hätte optimiert werden müssen, wurden für die Klonierung des Modellgens die beiden störenden Pyrimidine in der Sequenz durch Purine ersetzt. Die transkriptionell fusionierten Leserahmen wurden unter Kontrolle des konstitutiven 35S-CaMV-Promotors gestellt (s. Abb. 7).

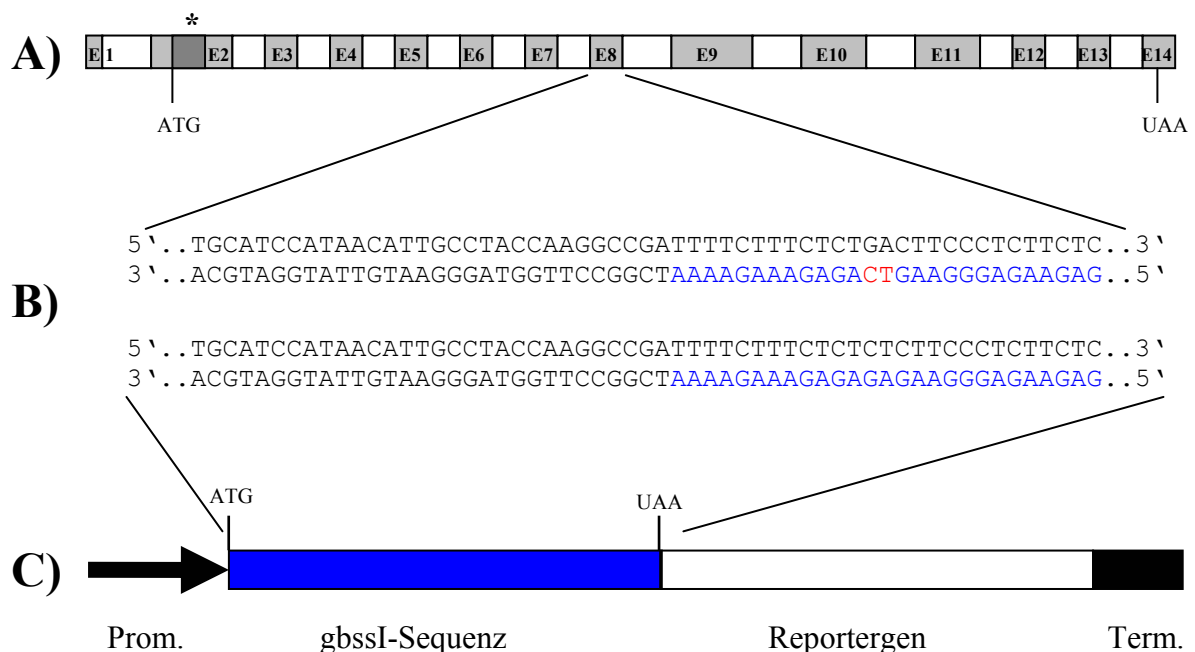


Abb. 7: A) Schematische Darstellung der Exon-/Intron-Struktur des gbssI-Gens mit einem Polypurinbereich in Exon 8. \* Transitpeptid  
 B) oben: Darstellung der natürlichen Purinsequenz (blau, oben) mit 2 Pyrimidinen (rot)  
 unten: Darstellung der für die Versuche optimierten Polypurin-Sequenz (blau, darunter)  
 C) Ein größerer Abschnitt aus dem gbssI-Gen (550 bp) mit Polypurin-Sequenz (27 bp) oder die Polypurin-Sequenz allein (27 bp) wurden für die Fusionen mit dem gfp- bzw. bar-Gen verwendet.

Das verwendete gbssI-Gen der Kartoffel ist aus mehreren Gründen besonders gut für die Etablierung einer Methode zur Genmodifizierung geeignet.

Es enthält eine ausreichend lange Polypurinsequenz zur Ausbildung von Triplehelices.

Zudem würde aufgrund der Beteiligung des Gens an der Stärkebiosynthese eine Änderung der Genfunktion einen wirtschaftlich interessanten Phänotyp hervorrufen. Daher könnten Erkenntnisse des Projektes direkt in eine sinnvolle praktische Anwendung überführt werden.

## 4.2 Triplehelix-Bildung *in vitro* an kurzer linearer Ziel-DNA

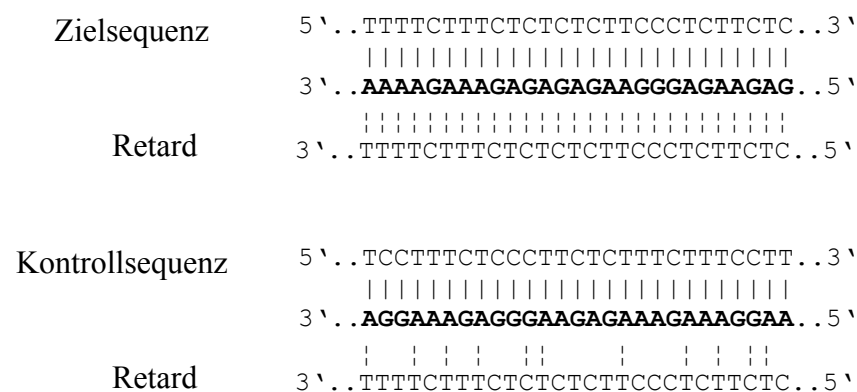
Zu Beginn der Arbeiten sollte die Frage geklärt werden, ob Triplehelix-bildende Oligonukleotide effizient und sequenzspezifisch an die in diesem Projekt verwendete Polypurinsequenz aus dem gbssI-Gen der Kartoffel binden und welche Bedingungen für eine erfolgreiche Triplehelix-Bildung eingehalten werden müssen. Diese Fragestellungen wurden mit Hilfe von *in vitro* durchgeführten Hybridisierungs-Experimenten untersucht.

### 4.2.1 Triplehelix-bildende Oligonukleotide für die *in vitro*-Hybridisierung

Für den Einsatz von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden gibt es grundsätzlich zwei mögliche Varianten: den Purin-Typ mit antiparalleler Bindung an die Polypurinregion des Zielgens und den Pyrimidin-Typ mit paralleler Bindung an das Zielgen. In der Literatur werden den Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden des Pyrimidin-Typs allgemein günstigere Bindungseigenschaften an das Zielgen zugeschrieben (s. 1.6). Deshalb wurden in dieser Arbeit ausschließlich Triplehelix-bildende Oligonukleotide des Pyrimidin-Typs verwendet.

Verschiedene Arbeiten belegen eine Notwendigkeit für die Modifizierung einzelner Basen. So ist z.B. die Protonierung des C5-Atoms von Cytosin erforderlich für die Ausbildung von *Hoogsteen*-Bindungen. Da dies unter zellulären pH-Bedingungen nicht sicher vorausgesetzt werden kann, wurde als Alternative ausschließlich 5-Methylcytosin verwendet (Xodo *et al.*, 1991; Grigoriev *et al.*, 1992). Zum Schutz vor 3'-Exonukleasen hat sich die Verwendung von Phosphorothioat-Bindungen für die letzten zwei Basen des Triplehelix-Oligonukleotides als wirksam erwiesen (Agrawal *et al.*, 1997 und Gamper *et al.*, 2000b). Aus diesem Grund wurden alle verwendeten Triplehelix-bildenden Oligonukleotide durch zwei Phosphorothioat-Bindungen am 3'-Ende modifiziert.

Als Kontrolle für die Sequenzspezifität diente eine Ziel-DNA mit durchmischter Purinsequenz. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese Kontrollsequenz die gleiche Basenzusammensetzung und die gleiche Länge wie die entsprechende Zielsequenz hatte. Ferner wurde sichergestellt, dass die gleichen Modifizierungen verwendet wurden.



**Abb. 8:** Das Triplehelix-bildende Oligonukleotid Retard zusammen mit Zielsequenz (optimierte Polypurinsequenz aus gbssI) und Kontrollsequenz (durchmischte Polypurinsequenz).  
( | *Watson-Crick*-Bindungen, | *Hoogsteen*-Bindungen )

Die als Zielsequenz dienende DNA entsprach der Basenabfolge im Polypurinbereich des gbssI-Gens. Die beiden in der ursprünglichen Sequenz vorkommenden Pyrimidine wurden durch Purinbasen ersetzt. Zusammen mit dem Triplehelix-Oligonukleotid Retard sollte die Ausbildung einer idealen Triplehelix-Struktur möglich sein (s. Abb. 8).

Als Kontrollvariante für die *in vitro*-Hybridisierungsversuche wurde eine zufällig durchmischte Polypurinsequenz verwendet. Diese Kontrolle diente der Überprüfung der Sequenzspezifität der Triplehelix-Bildung. Sie bestand aus der gleichen Anzahl Purinbasen wie die Zielsequenz. Die Ausbildung von *Hoogsteen*-Bindungen mit dem Oligonukleotid Retard sollte nur an zufällig passenden Basen möglich sein. Damit war die Bildung einer Triplehelix-Struktur mit dieser stark abweichenden Kontrollsequenz sehr unwahrscheinlich.

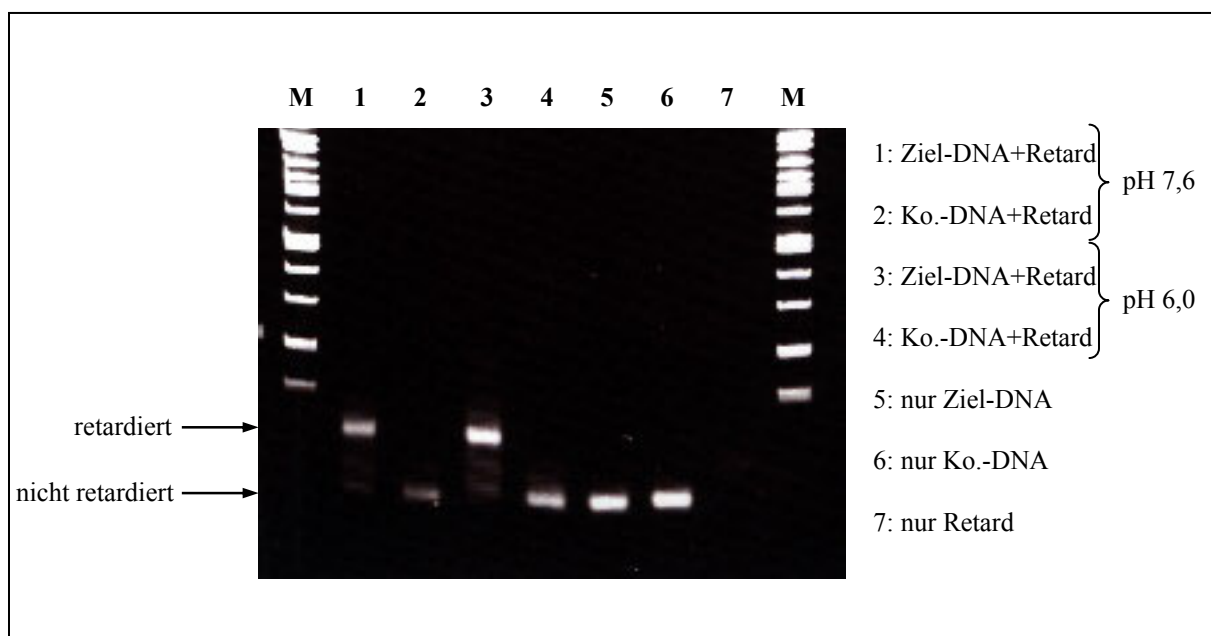
#### 4.2.2 Nachweis der Triplehelix-Bildung durch Gelretardation

Im Anschluss an die Entwicklung der Triplehelix-bildenden Oligonukleotide wurde deren Fähigkeit zu einer spezifischen Triplehelixbildung mit der Zielsequenz überprüft. Dazu wurden die Oligonukleotide an den beschriebenen kurzen linearen DNA-Fragmenten getestet.

Die ersten *in vitro*-Hybridisierungen wurden unter den von Perkins *et al.* (1998) beschriebenen Bedingungen in einem Puffer mit pH 7,6 bei 37°C durchgeführt und für 72 h inkubiert. Mit dem in der genannten Veröffentlichung beschriebenen Gel-Laufpuffer mit einem pH-Wert von 7,6 war ein Nachweis von Triplehelices nicht möglich. Durch Verwendung eines sauren Laufpuffers mit einem pH-Wert von 6,0 nach Gamper *et al.* (1998) für die Gelelektrophorese konnte die *in vitro*-Ausbildung von Triplehelices nachgewiesen werden.

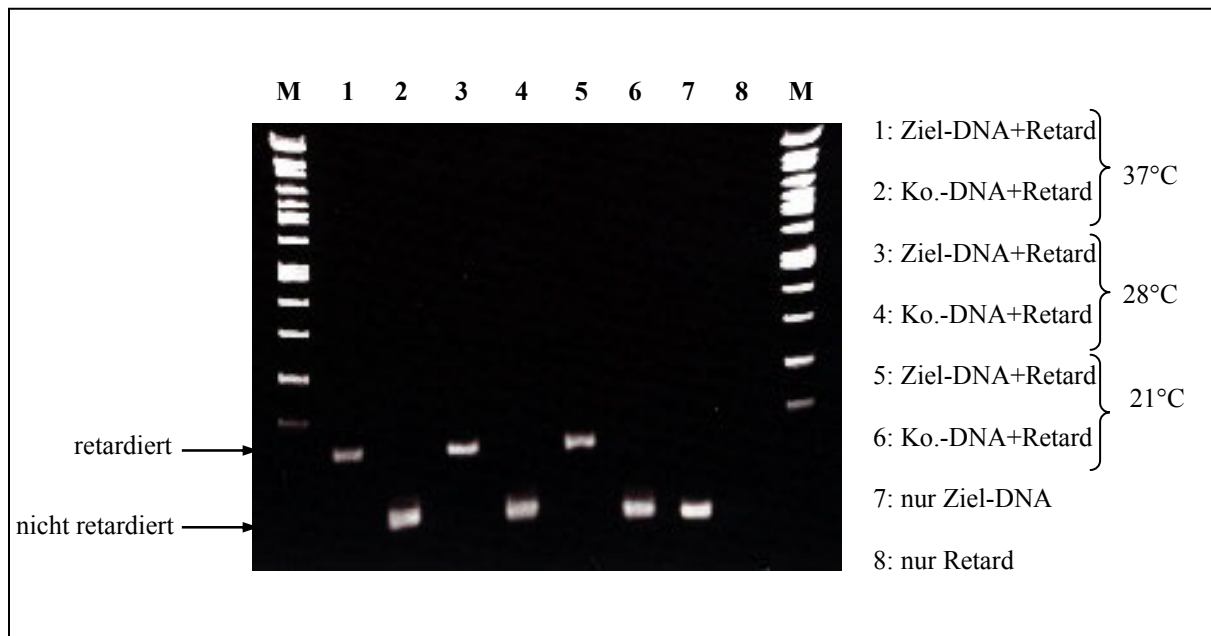
Da die bisher veröffentlichten Parameter der Triplehelix-Bildung für das tierische System optimiert waren, dienten die folgenden Schritte der Annäherung der Hybridisierungs-Parameter an die physiologischen Bedingungen in Pflanzenzellen.

Als Erstes wurde der pH-Wert während der Hybridisierung von 7,6 auf 6,0 abgesenkt. Damit erfolgte eine Annäherung an das saure Milieu in pflanzlichen Zellen. Die Proben mit Triplehelices waren in ihrem Laufverhalten während der Gelelektrophorese gegenüber den Kontrollen deutlich retardiert. Die durchmischte Kontrollsequenz wurde von den Triplehelix-Oligonukleotiden nicht gebunden. Diese Kontrollansätze zeigten keinerlei Retardation in der Gelelektrophorese. Es gab zwischen den Versuchen mit verschiedenen pH-Werten keine Unterschiede in der Triplehelix-Bildung (s. Abb. 9).



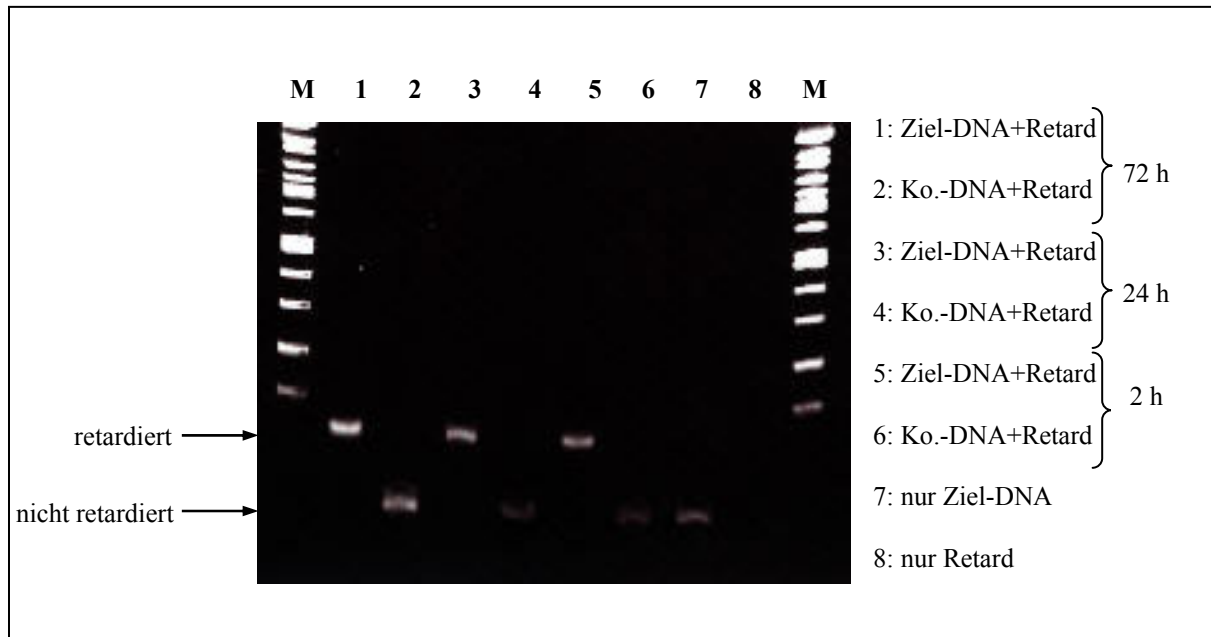
**Abb. 9: Gelretardationsanalyse des Triplehelix-bildenden Oligonukleotids Retard und verschiedener doppelsträngiger DNA-Sequenzen in Abhängigkeit vom pH-Wert.** Doppelsträngige Ziel-DNA bzw. Ko.-DNA wurde für 72 h bei 37°C mit dem Triplehelix-bildenden Oligonukleotid Retard in einem Volumen von 100 µl inkubiert. Davon wurde ein 20 µl-Aliquot auf ein 0,8 %iges MDE-Gel aufgetragen und in einem Laufpuffer bei pH 6,0 und einer Spannung von 120 V für ca. 3 h aufgetrennt. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte durch Anfärben mit einer Gelstar®-Lösung.

Als weitere wichtige Einflussgröße wurde nun die Hybridisierungstemperatur schrittweise abgesenkt, um den Bedingungen der Pflanzenkultur näher zu kommen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei 28°C als auch bei 21°C die Ausbildung von Triplehelices unvermindert effizient erfolgte. Dabei ist besonders erwähnenswert, dass trotz niedrigerer Hybridisierungstemperaturen keine Zunahme unspezifischer Bindungen zu beobachten war (s. Abb. 10).



**Abb. 10: Gelretardationsanalyse des Triplehelix-bildenden Oligonukleotids Retard und verschiedener doppelsträngiger DNA-Sequenzen nach Hybridisierungen bei verschiedenen Temperaturen.** Doppelsträngige Ziel-DNA wurde für 72 h bei den angegebenen Temperaturen mit dem Triplehelix-bildenden Oligonukleotid Retard in einem Volumen von 100 µl bei pH 6,0 inkubiert. Davon wurde ein 20 µl-Aliquot auf ein 0,8 %iges MDE-Gel aufgetragen und in einem Laufpuffer bei pH 6,0 und einer Spannung von 120 V für ca. 3 h aufgetrennt. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte durch Anfärben mit einer Gelstar®-Lösung.

Als nächster praxisrelevanter Parameter wurde der Einfluss der Hybridisierungsdauer untersucht. Da bifunktionelle Oligonukleotide in der praktischen Anwendung nur eine begrenzte Zeit wirksam sein können, bis sie von Exonukleasen abgebaut werden, ist eine möglichst schnelle Ausbildung von Triplehelices von großer Bedeutung. Die Hybridisierungsdauer wurde schrittweise von 72 h über 24 h auf 2 h gesenkt. Die Ergebnisse zeigten keine Abnahme der Hybridisierungs-Effizienz innerhalb der Zeitreihe (s. Abb. 11).



**Abb. 11: Gelretardationsanalyse des Triplehelix-bildenden Oligonukleotids Retard und verschiedener doppelsträngiger DNA-Sequenzen nach Hybridisierungen für verschieden lange Zeiten.** Doppelsträngige Ziel-DNA wurde bei RT für die angegebenen Zeiten mit dem Triplehelix-bildenden Oligonukleotid Retard in einem Volumen von 100 µl bei pH 6,0 inkubiert. Davon wurde ein 20 µl-Aliquot auf ein 0,8 % iges MDE-Gel aufgetragen und in einem Laufpuffer bei pH 6,0 und einer Spannung von 120 V für ca. 3 h aufgetrennt. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte durch Anfärben mit einer Gelstar®-Lösung.

Pro Ansatz wurden 5,5 µg Oligonukleotid ( $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) und 600 ng doppelsträngige Ziel-DNA ( $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) zusammengegeben. Das auf das Gel aufgetragene Teilvolumen des Hybridisierungsansatzes enthielt 45 ng Ziel-DNA. Die Nachweisgrenze des DNA-Farbstoffes Gelstar® liegt bei 20 pg doppelsträngiger DNA. Da auf den MDE®-Gelen ausser den retardierten Banden keine weiteren zu sehen waren, muss der Anteil von nichtgebundener Ziel-DNA unter 20 pg und damit unter 0,04 % der eingesetzten Menge liegen.

Bemerkenswert ist die Sequenzspezifität der Triplehelix-Bildung. Obwohl die Triplehelix-bildenden Oligonukleotide in einem zehnfachen molaren Überschuss zugegeben wurden, konnte keine unspezifische Bindung festgestellt werden. Falls diese dennoch auftrat, kann sie aufgrund der Nachweisempfindlichkeit des DNA-Farbstoffes auf eine Häufigkeit von kleiner als 0,04 % beziffert werden.

Die Absenkung des pH-Wertes von 7,6 auf 6,0 während der Hybridisierung, die auf Pflanzenkultur-Bedingungen abgesenkte Hybridisierungstemperatur sowie die stark verkürzte Hybridisierungsdauer hatten keinen negativen Einfluss auf die sequenzspezifische Ausbildung von Triplehelices.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Gelretardationsversuche eine gute Effizienz und eine hohe Sequenzspezifität der Triplehelix-Bildung unter praxisrelevanten Bedingungen.

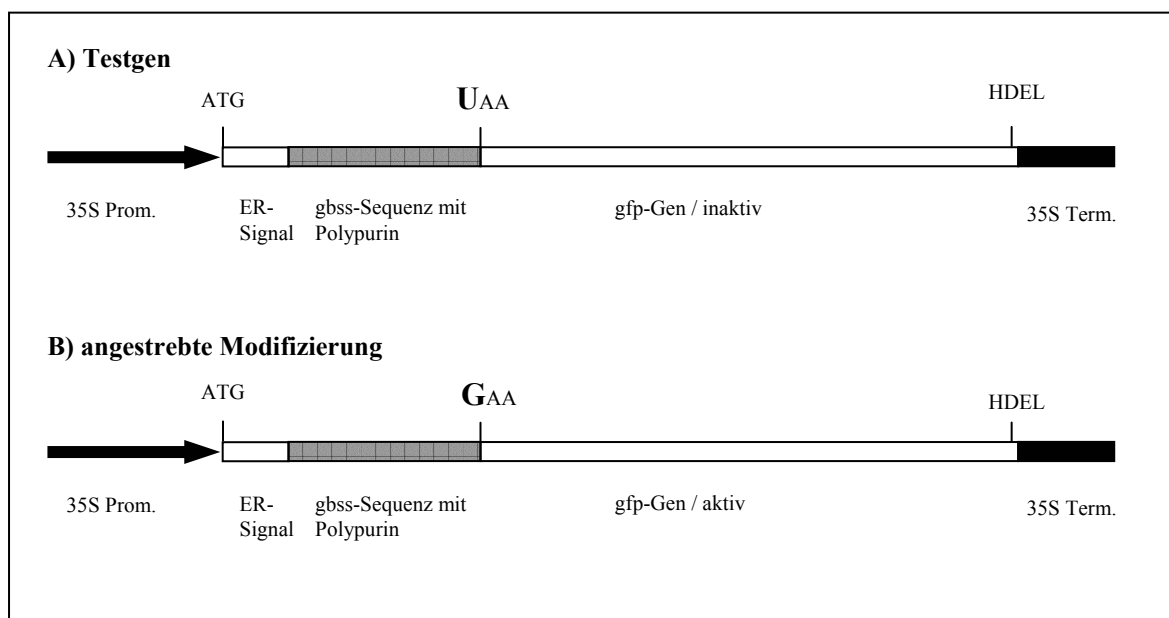
### 4.3 Das Modellgensystem aus gfp-Gen und 550 bp-gbssI-Insert

#### 4.3.1 Erstellen von gfp-Modellgenen mit 550 bp-gbssI-Insert

Es wurden jeweils zwei Modellgene erstellt. Ein Modellgen war so konstruiert, dass in der Pflanze ein Fusionsprotein exprimiert wurde (Kontrollgen). Ein weiteres Modellgen enthielt ein Stop-Codon, das die Expression eines Fusionsproteins verhinderte (Testgen). Die optimierte Homopurinregion des Modellgens gbssI befand sich am äußersten 3'-Ende, direkt vor dem Beginn der gfp-Sequenz. Die verwendete Sequenz entsprach Exon 3 bis 8 des gbssI-Gens und war ca. 550 bp lang. Für die Fusionen wurden verschiedene Varianten des gfp-Gens verwendet. Die Konstrukte wurden in den Binärvektor pLH9000 (Hausmann u. Töpfer, 1999) überführt. Die fertiggestellten Konstrukte wurden vor der Transformation routinemäßig sequenziert. Mit fehlerfreien Binärvektoren wurden Transformationen mit *Arabidopsis thaliana* und Kartoffel durchgeführt.

##### 4.3.1.1 Fusionsgene mit mgfp5-ER

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurden Konstrukte auf Basis des mgfp5-ER-Gens (Siemering *et al.*, 1996) erstellt (s. Abb. 12). Durch die *targeting*-Sequenz dieses Gens wird das Fusionsprotein in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Die HDEL-Sequenz am 3'-Ende des gfp-Gens retardierte das Fusionsprotein im ER, wodurch sein negativer Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit des Gewebes minimiert ist (Haseloff *et al.*, 1997).



**Abb. 12:** Modell der Testgenvariante des Fusionsgens bestehend aus dem 550 bp-Bereich des gbssI-Gens mit dem darin enthaltenen Polypurin-Bereich und dem mgfp5-ER-Gen.



#### 4.3.1.2 Fusionsgene mit pCK S65C gfp

Für die Transformation von Kartoffelpflanzen wurden die Modellgene auf der Basis des Plasmids pCK S65C gfp (Reichel *et al.*, 1996) erstellt (s. Abb. 13). Dieses GFP-Protein ist durch eine Veränderung der Aminosäuresequenz für die Anwendung in Pflanzen optimiert. Die cytosolische Lokalisierung hat bei der Transformation von Kartoffeln keinen negativen Einfluss auf die Regenerationsrate. Das gfp-Gen dieses Plasmids wurde bereits erfolgreich für eine N-terminale Fusion eingesetzt (Dieterich, 2000). Fertiggestellte Fusionskonstrukte wurden in den Binärvektor pLH9000 überführt. Sequenzierte Binärvektoren mit fehlerfreien Modellgenen wurden für die Transformationen von Pflanzen eingesetzt.

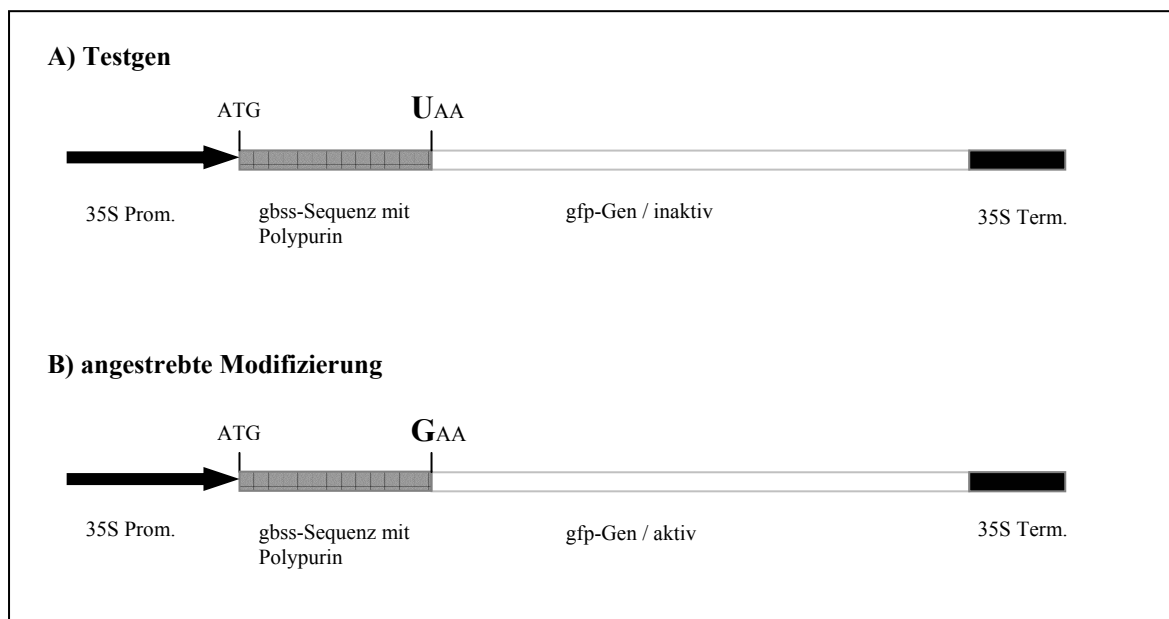


Abb. 13: Modell der Testgenvariante des Fusionsgens mit Stop-Codon zwischen dem 550 bp-Bereich aus dem gbssI-Gen mit Polypurin-Bereich und dem gfp-Gen aus pCK S65C gfp.

#### 4.3.2 Erstellen transgener *Arabidopsis*-Linien mit 550 bp-gfp-Modellgen

Es wurden mittels *floral dip*-Methode (mod. nach Clough und Bent, 1998) sowohl Kontrollgen (KG)-Linien als auch Testgen (TG)-Linien erstellt. Die auf Selektionsmedium gekeimten Samen wurden in Erde überführt und im Gewächshaus weiterkultiviert. Die Integration des Modellgens wurde durch PCR-Analyse von Blattmaterial nachgewiesen. Alle selektierten 10 transgenen Linien wurden fluoreszenzmikroskopisch auf die Expression des Fusionsgens untersucht. Keine der getesteten Kontrollgen-Linien mit dem gfp-Fusionsgen ohne Stop-Codon zeigte eine gfp-Fluoreszenz.

Die regenerierten TG-Linien zeigten, wie erwartet, alle keine gfp-Fluoreszenz.

#### **4.3.3 Erstellen transgener Kartoffel-Linien mit 550 bp-gfp-Modellgen**

Es wurden aus mehreren Transformationsansätzen 34 transgene KG-Linien regeneriert. Die Integration des Modellgens wurde in Blattproben von auf Selektionsmedium regenerierten Pflanzen mittels PCR nachgewiesen. Alle Linien wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei keiner KG-Linie konnte gfp-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die TG-Linien zeigten, wie erwartet, alle keine gfp-Fluoreszenz.

Da mit beiden Pflanzenarten und zwei unterschiedlichen gfp-Varianten keine Fluoreszenz in den als Positivkontrollen regenerierten KG-Linien festgestellt werden konnte, wurde nur die zweite Variante eines verkürzten Modellgens weitergeführt (4.4).

## 4.4 Das Modellgensystem aus gfp-Gen und 39 bp-gbssI-Insert

Die für die Erstellung der verkürzten Variante des gfp-Modellgens verwendete Region aus dem gbssI-Gen beschränkte sich auf die für die Bindung der Triplehelix-bildenden Oligonukleotide absolut notwendigen 27 Purinbasen und die für die Ligation angefügten *NcoI*-bzw. *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen. Die Gesamtlänge des Inserts betrug damit 39 bp. Vor der Ligation des Modellgens in den Binärvektor pLH9000 wurde die fehlerfreie Konstruktion durch Sequenzierungen überprüft.

### 4.4.1 Erstellen von gfp-Modellgenen mit 39 bp-gbssI-Insert

#### 4.4.1.1 Fusionsgen mit mgfp5-ER

Für die Transformation von *A. thaliana* wurde ein Konstrukt auf Basis des ER-lokalisierten mgfp5-ER-Gens (Siemering *et al.*, 1996) erstellt (s. Abb. 14). Die Ligation der 39 bp-gbssI-Sequenz erfolgte über die an die Polypurinsequenz angefügten *EcoRI*-sites zwischen das ER-Lokalisierungssignal und den Beginn der gfp-cDNA.

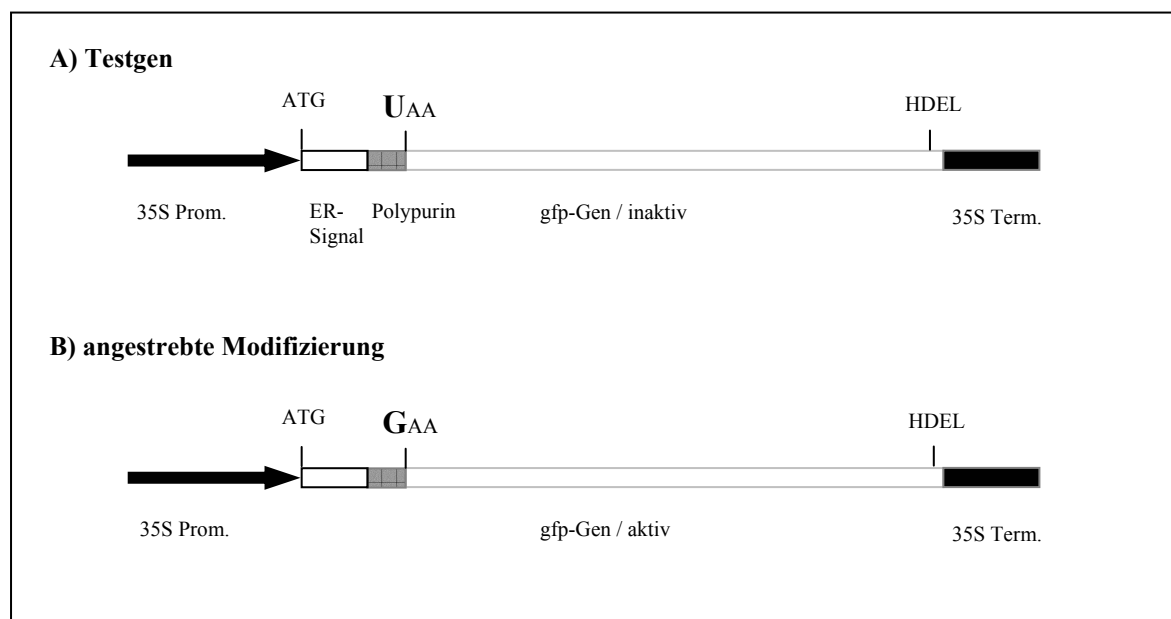


Abb. 14: Modell der Testgenvariante des Fusionsgens bestehend aus dem 39 bp-Insert zwischen dem ER-Targeting-Signal und der gfp-cDNA des mgfp5-ER-Gens.

#### 4.4.1.2 Fusionsgen mit pGJ304

Für den Einsatz in Kartoffel-Pflanzen wurde ein Modellgen auf der Basis einer cytosolisch lokalisierten Variante des gfp-Gens verwendet (s. Abb. 15). Das gfp-Gen aus pGJ304 ist durch eine geänderte *codon-usage* für eine Expression in Pflanzen optimiert und zeigt eine intensivere gfp-Fluoreszenz als herkömmliche gfp-Varianten (Jach, G., pers. Mitteilung). Die Ligation der 39 bp-gbssI-Sequenz erfolgte über die an die Polypurinsequenz angefügten *NcoI*-sites an das 5'-Ende der gfp-cDNA.

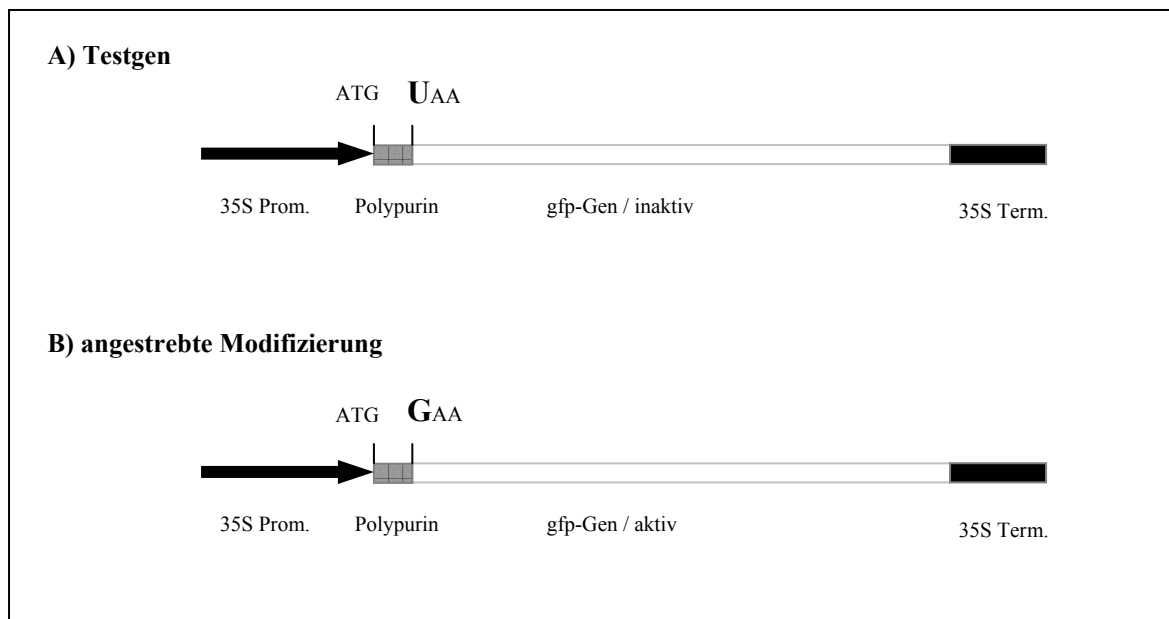


Abb. 15: Modell der Testgenvariante des Fusionsgens bestehend aus dem 39 bp-Insert und dem gfp-Gen aus pGJ304

#### 4.4.2 Transiente Testung der 39 bp gfp-Modellgene in Protoplasten

Die erstellten verkürzten Konstrukte auf der Basis des mgfp5-ER und des gfp-Gens aus pGJ304 und wurden in Kartoffelprotoplasten auf ihre Expression getestet. Dazu wurden ca. 20 µg Plasmid-DNA in frisch isolierte Kartoffelprotoplasten elektroporiert. Als Positiv-Kontrolle diente ein Plasmid mit unverändertem gfp-Gen, als Negativ-Kontrolle das auf der Basis des entsprechenden gfp-Gens erstellte TG-Konstrukt mit Stop-Codon. In allen durchgeführten Experimenten konnte in den Proben, die mit KG-Konstrukten transformiert wurden, eine mit den Positiv-Kontrollen vergleichbare gfp-Fluoreszenz festgestellt werden. Die mit TG-Konstrukten transformierten Proben zeigten in keinem Fall eine gfp-Fluoreszenz. Aufgrund dieser erfolgreichen Nachweises der Funktionalität der verkürzten Varianten des Modellgens wurden Transformationen zur Regeneration stabiler transgener *Arabidopsis*- und Kartoffel-Linien durchgeführt.

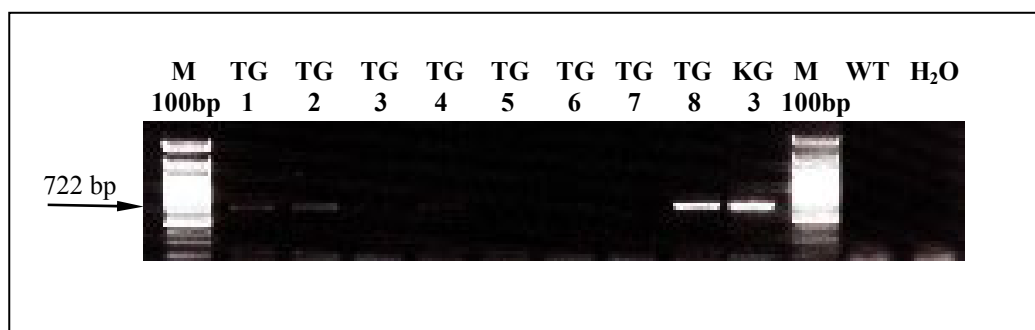
#### 4.4.3 Erstellen transgener Pflanzen mit 39 bp-gfp-Modellgenen

Es wurden drei Transformationen von *A. thaliana* nach der *floral dip*-Methode durchgeführt. Die geernteten Samen wurden oberflächensterilisiert und auf Selektionsmedium zur Keimung gebracht. Ein Teil der regenerierten transgenen Pflanzen wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Von vier untersuchten Pflanzen zeigten zwei eine deutliche gfp-Fluoreszenz. Die TG-Linien zeigten erwartungsgemäß keine gfp-Fluoreszenz.

#### 4.4.4 Transkriptionsanalyse transgener *Arabidopsis*-Linien mittels RT-PCR

Zur späteren Verwendung in Versuchen zur Modifizierung des Modellgens mussten einige gut exprimierende Linien ausgewählt werden. Da die TG-Linien funktionsgemäß keine Translation eines Fusionsproteins und damit auch keine gfp-Fluoreszenz zeigten, mussten sie auf der Transkriptionsebene untersucht werden.

Die RT-PCR eignet sich gut, um mit überschaubarem Aufwand die Transkription des Modellgens vieler Pflanzen-Linien parallel untersuchen zu können. Dazu wurden aus TG-Linien RNA-Präparationen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine KG-Linie mit nachgewiesener gfp-Fluoreszenz. Die Menge der jeweils aufgereinigten RNA wurde photometrisch gemessen. Um eine relative Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten, wurden als Template für die reverse Transkription gleiche Mengen Gesamt-RNA eingesetzt.

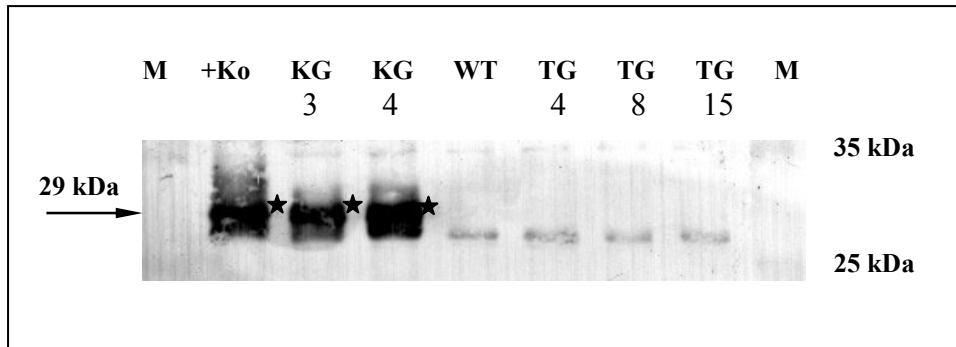


**Abb. 16: RT-PCR von *Arabidopsis*-KG- und -TG-Linien.** Gleiche Ausgangsmengen RNA (100 ng) wurden für eine *One-Step* RT-PCR eingesetzt. Es wurde ein 722 bp Fragment des gfp-Gens amplifiziert. TG: TG-Linien 1-8, KG3: Positiv-Kontrolle, WT: Negativ-Kontrolle

Die PCR-Amplifizierung der Transkripte ergab sehr unterschiedliche Produktmengen (s. Abb. 16). Neben einer Linie mit einem starken Signal (TG8) und zwei Linien mit mittelstarken Signalen (TG1 und 2) wurden auch Linien mit schwacher Transkription des Transgens festgestellt (TG3 und 4). Für die weiteren Arbeiten wurden die drei TG-Linien mit den stärksten RT-PCR-Signalen ausgewählt. Diese sollten eine gute Transkription des Modellgens aufweisen.

#### 4.4.5 Western-Analyse transgener *Arabidopsis*-Linien

Zum Vergleich der Translation des Modellgens in KG- und TG-Linien wurde das gfp-Fusionsprotein mittels Western-Analyse nachgewiesen (s. Abb. 17). Als Positiv-Kontrolle wurde eine Kartoffel-Linie verwendet, die das mgfp5-ER Gen stabil exprimierte.



**Abb. 17: Immunoblot einer Western-Analyse der aus transgenen *Arabidopsis*-Linien isolierten Proteine.** erster Antikörper: Anti-GFP aus Maus, zweiter Antikörper: Anti-Maus aus Kaninchen gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase. M: *prestained protein ladder* 10-180 kDa. Das in den Linien KG3 und KG4 nachgewiesene Protein (\*) hat eine Größe von ca. 29 kDa. Das als Positiv-Kontrolle verwendete GFP- Protein aus einer mgfp5-ER-exprimierenden Kartoffel-Linie hat die gleiche Größe. In den Linien TG4, 8 und 15 wurde ebenso wie in der WT-Kontrolle kein GFP-Protein nachgewiesen.

Die Western-Analyse zeigt eine deutliche Expression des 39 bp gfp-Modellgens in den KG-Linien 3 und 4. Die Größe des Proteins und die Intensität des Signals stimmt mit der Positiv-Kontrolle überein. Die TG-Linien 4, 8 und 15 zeigen ebenso wie die Wildtyp-Kontrolle keine GFP-Bande. Die wesentlich kleinere Bande (ca. 27 kDa) ist auch in der Wildtyp-Kontrolle enthalten und somit als unspezifischer Hintergrund einzuordnen. Die Ergebnisse der Western-Analyse stimmen mit denen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen überein.

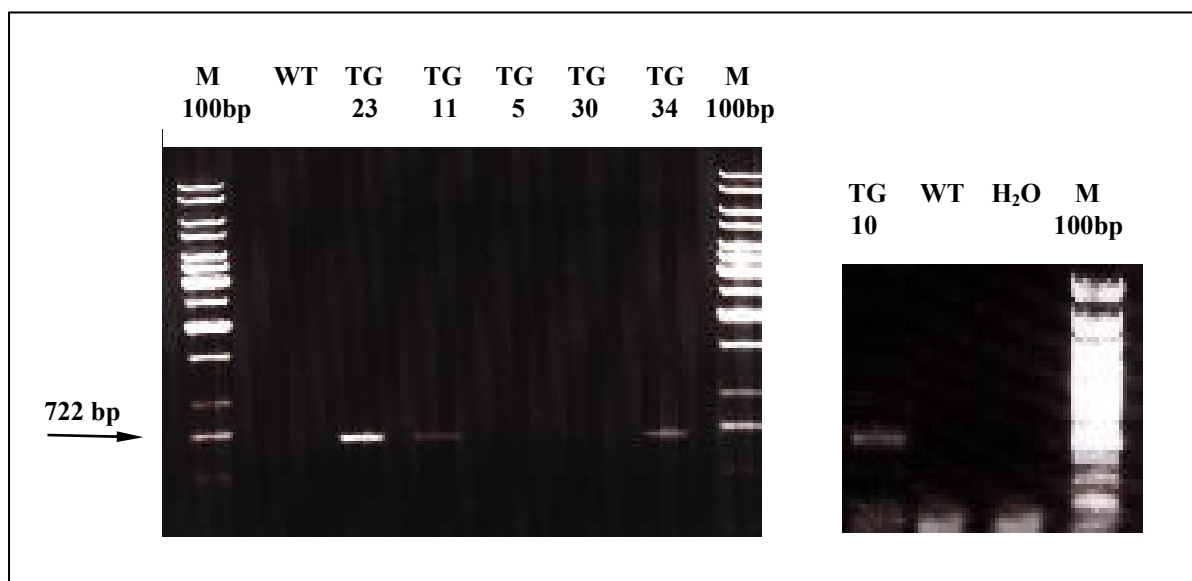
#### 4.4.6 Transkriptionsanalyse transgener Kartoffel-Linien mittels RT-PCR

Mit den verkürzten Konstrukten wurden 2 Kartoffel-Transformationen durchgeführt. Die auf Selektionsmedium regenerierten Pflanzen wurden am Fluoreszenzmikroskop auf eine gfp-Fluoreszenz untersucht.

Es konnten zwei KG-Linien mit charakteristischem gfp-Fluoreszenzspektrum gefunden werden. Die Aktivität des Fusionsproteins in transgenen Kartoffelpflanzen bestätigte die Ergebnisse der transienten Testungen in Protoplasten. Die kurze Variante des Modellgen-Konstruktes war somit geeignet für die Anwendung im geplanten gfp-Aktivierungsansatz.

Alle regenerierten TG-Linien mit Stop-Codon zwischen dem Purinabschnitt und der gfp-Sequenz wurden auf eine gfp-Fluoreszenz untersucht. In keiner Linie konnte eine solche Fluoreszenz festgestellt werden. Damit wurde die korrekte Funktion des Modellgens gezeigt.

Zur Auswahl geeigneter TG-Linien mit starker Transkription wurde RT-PCR-Analysen durchgeführt (s. Abb. 18).

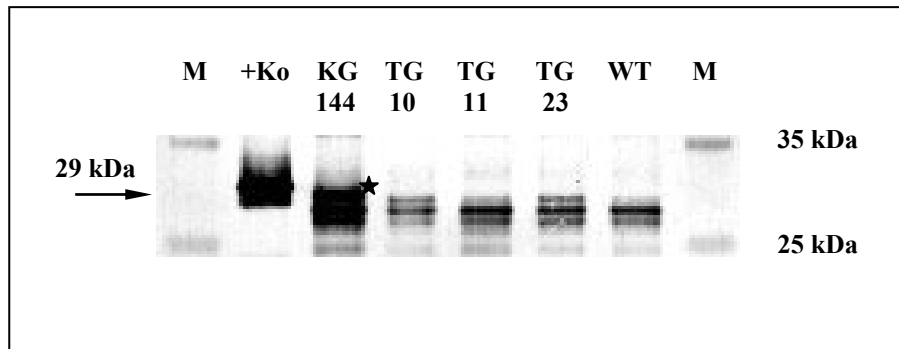


**Abb. 18: RT-PCR von Kartoffel-KG- und -TG-Linien.** Gleiche Ausgangsmengen RNA (100 ng) wurden für eine *One-Step* RT-PCR eingesetzt. Es wurde ein 722 bp Fragment des gfp-Gens amplifiziert. TG: TG-Linien, WT: WT-Kartoffel-Linie als Negativ-Kontrolle, M: 100 bp-Marker.

Mit Hilfe der RT-PCR-Analyse wurde in den Linien TG10, TG11, TG23 und TG34 eine deutliche Transkription des Modellgens festgestellt. Diese Linien wurden für die nachfolgenden Versuche ausgewählt und zur Bereitstellung von ausreichend Blattmaterial umfangreich *in vitro* vermehrt.

#### 4.4.7 Western Analyse transgener Kartoffel-Linien

Zum Vergleich der Translation des Modellgens in KG- und TG-Linien wurde das gfp-Fusionsprotein mittels Western-Analyse nachgewiesen (s. Abb. 19). Als Positiv-Kontrolle wurde eine Kartoffel-Linie verwendet, die das mgfp5-ER Gen stabil exprimierte.



**Abb. 19: Immunoblot einer Western-Analyse der aus transgenen Kartoffel-Linien isolierten Proteine.**

erster Antikörper: Anti-GFP aus Maus, zweiter Antikörper: Anti-Maus aus Kaninchen gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase. Das in der Linie KG144 nachgewiesene GFP-Protein (\*) hat eine Größe von ca. 29 kDa. Das als Positiv-Kontrolle verwendete GFP-Protein ist durch eine ER-Lokalisierungssequenz etwas größer. In den Linien TG10,11 und 23 wurde ebenso wie in der WT-Kontrolle kein GFP-Protein nachgewiesen.

Die Western-Analyse zeigt eine deutliche Expression des 39 bp gfp-Modellgens in der KG-Linien 144. Die Größe des Proteins (ca. 28 kDa) ist durch die nicht vorhandene ER-targeting Sequenz etwas geringer als in der Positiv-Kontrolle. Die TG-Linien 10, 11 und 23 zeigen ebenso wie die Wildtyp-Kontrolle keine GFP-Bande. Die etwas kleineren Banden (ca. 27 kDa) sind auch in der Wildtyp-Kontrolle enthalten und somit als unspezifischer Hintergrund einzuordnen. Die Ergebnisse der Western-Analyse stimmen mit denen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen überein.

#### 4.4.8 Untersuchung der Triplehelix-Bildung *in vitro* an isolierter genomischer DNA

Vor den Versuchen zur *in situ*-Modifizierung des Modellgens wurde die Triplehelixbildung an isolierter genomischer DNA untersucht. Die Anforderungen an die Sequenzspezifität des Triplehelix-bildenden Oligonukleotids waren dabei durch den genomischen Kontext höher als im Fall kurzer linearer DNA-Fragmente (s. 4.2). Die Versuche wurden exemplarisch an genomischer DNA der Linie TG11 durchgeführt.

Zum Nachweis von Triplehelix-Strukturen wurde die erstmals von Besch *et al.* (2002) veröffentlichte Methode der Magnetischen Separation in modifizierter Form angewandt (s. 3.10.2). Die Spaltung der genomischen DNA vor der Separation erfolgte mit dem Restriktionsenzym *Hind*III. Das dabei entstehende Fragment enthielt neben der für die Triplehelix-Bildung notwendigen Polypurin-Zielsequenz auch das in der abschließenden PCR nachzuweisende gfp-Gen. Es war mit ca. 3 kb Größe für die Bindung an Streptavidinbeads (Dynabeads M-280®) gut geeignet.



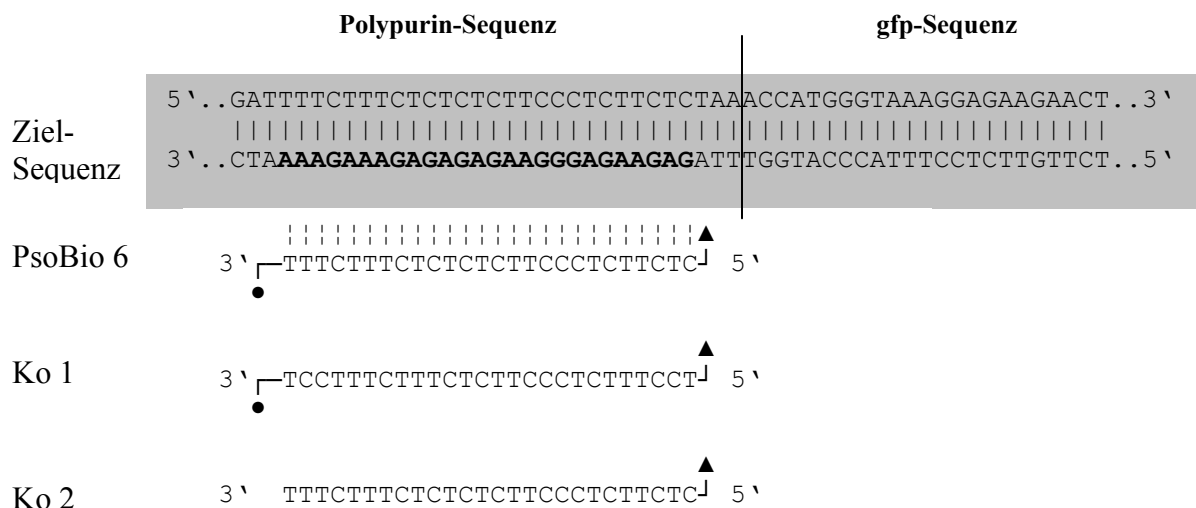
#### 4.4.8.1 Triplehelix-bildende Oligonukleotide für die *in vitro*-Hybridisierung

Die Triplehelix-bildenden Oligonukleotide für die *in vitro*-Hybridisierung und deren Nachweis durch anschließende magnetische Separation mussten drei Voraussetzungen erfüllen.

Erstens musste die Sequenz der Oligonukleotide die Ausbildung einer Triplehelix ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde ein Triplehelix-bildendes Oligonukleotid vom Pyrimidin-Typ synthetisiert.

Zweitens sollte eine Modifizierung der Oligonukleotide eine stabile kovalente Bindung der Oligonukleotide an die Zielsequenz herstellen, um nachfolgende Aufreinigungs- und Nachweismethoden unbeschadet zu überstehen. Dafür wurde Psoralen als interkalierendes Molekül über eine C6-Kohlenstoff-Brücke an das Oligonukleotid gekoppelt. Nach einer Bestrahlung mit UVA konnte eine Quervernetzung der DNA-Doppelhelix eintreten und das Triplehelix-bildende Oligonukleotid konnte somit über das Psoralen-Molekül kovalent mit der Zielsequenz-DNA verbunden werden.

Drittens sollte das Oligonukleotid so modifiziert sein, dass eine spezifische Aufreinigung durch die magnetische Separation möglich war. Dazu wurde am 3'-Ende ein Biotin-Molekül an die Sequenz gekoppelt, so dass über eine spezifische Bindung an mit Streptavidin beschichtete magnetische Kügelchen eine Separation dieser Moleküle erfolgen konnte.



**Abb. 20: Zielsequenz und Triplehelix-bildende Oligonukleotide zur magnetischen Separation mit Psoralen (▲) - und Biotin (●) - Modifizierungen.** Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem 39 bp-gfp-Modellgen. Die Polypurinregion der Zielsequenz ist fett dargestellt. PsoBio 6: Triplehelix-bildendes Oligonukleotid mit beiden Modifizierungen, Ko 1: Kontroll-Oligonukleotid mit durchgemischter Pyrimidinsequenz, Ko 2: Kontroll-Oligonukleotid mit korrekter Pyrimidinsequenz aber ohne Biotin.

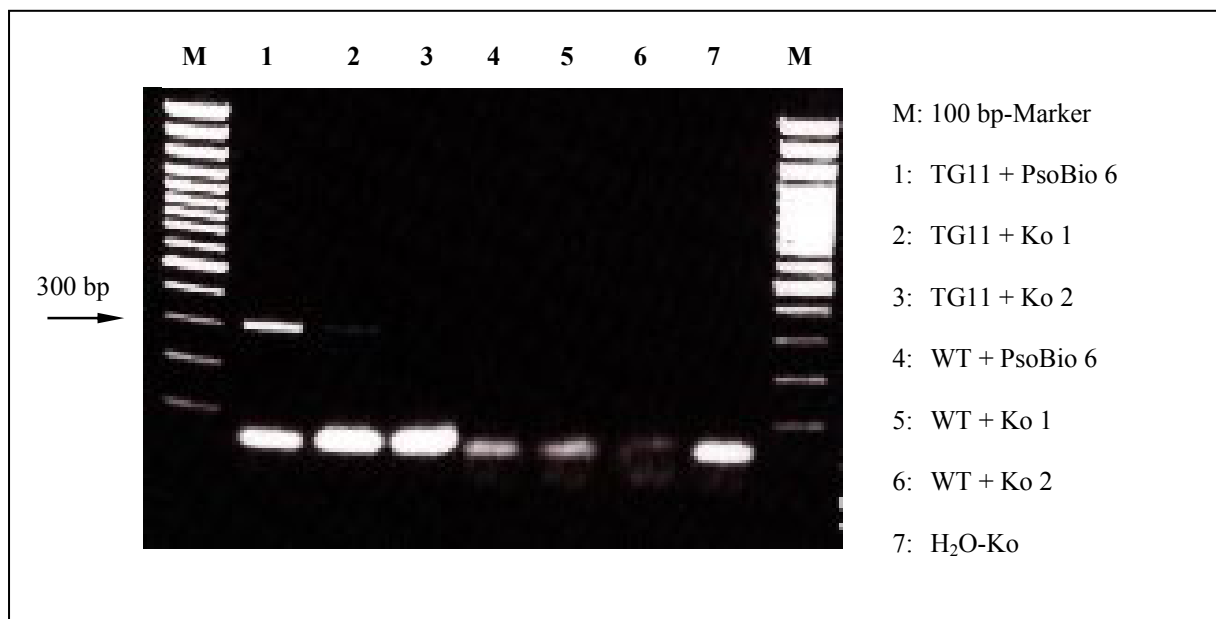
Als Kontrolle für die Sequenzspezifität der Triplehelix-Bildung wurde ein Oligonukleotid mit gleicher Länge aber zufällig durchgemischter Pyrimidinsequenz verwendet (Ko 1). Die Modifizierungen entsprachen vollständig denen des PsoBio 6.

Als weitere Kontrolle wurde ein Oligonukleotid mit unveränderter Sequenz und Psoralen, aber ohne Biotin verwendet (Ko 2). Diese Kontrolle sollte zeigen, ob das am Ende

amplifizierte PCR-Produkt auf ein nach der Methode der magnetischen Separation aufgereinigtes Template zurückzuführen war (s. Abb. 20).

#### 4.4.8.2 Nachweis der Triplehelix-Bildung durch magnetische Separation

Beispielhaft wurden die Untersuchungen zur Triplehelix-Bildung an isolierter genomischer DNA der transgenen Kartoffel-Linie TG11 durchgeführt (s. Abb. 21). Als Kontrolle diente genomische DNA aus Wildtyp-Pflanzen. Diese enthielt zwar eine mögliche, wenn auch nicht optimale, Zielsequenz für das Triplehelix-bildende Oligonukleotid in Form der natürlichen *gbssI*-Sequenz, aber nicht die *gfp*-Sequenz für den abschließenden PCR-Nachweis.



**Abb. 21: Nachweis der Triplehelix-Bildung des Oligonukleotids PsoBio6 an der Polypurinregion des Modellgens.** Isolierte und *HindIII*-geschnittene genomische DNA wurde hybridisiert mit einem sequenzspezifischen Pyrimidin-Oligonukleotid PsoBio 6 (Spur 1), mit einem Oligonukleotid durchmischter Pyrimidin-Sequenz Ko 1 (Spur 2) und einem nicht biotinyliertem Pyrimidin-Oligonukleotid korrekter Sequenz Ko 2 (Spur 3). Als Kontrolle wurde Wildtyp-DNA verwendet (Spur 4-6). Nach der magnetischen Separation wurde ein 300 bp-Fragment des Zielgens mittels PCR amplifiziert.

Das PCR-Produkt in Bahn 1 zeigte eine Triplehelix-Bildung im Falle des biotinylierten Oligonukleotids mit der korrekten Sequenz (PsoBio 6). In der Probe mit dem Kontroll-Oligonukleotid durchmischter Sequenz (Ko 1) wurde ein schwaches Produkt amplifiziert. Der Ansatz mit dem Oligonukleotid ohne Biotin (Ko 2) ergab kein PCR-Produkt.

Damit konnte *in vitro* die Triplehelix-Bildung für das verwendete Triplehelix-bildende Oligonukleotid (PsoBio 6) und die Linie TG11 mit der für die *in situ*-Modifizierungsversuche vorgesehenen kurzen Variante des *gfp*-Modellgens gezeigt werden.



Das als bi4gfp bezeichnete Oligonukleotid enthielt eine 15 Basen lange Triplehelix-bildende Domäne, die in paralleler Ausrichtung an die Zielsequenz binden konnte. Darauf folgte eine *Linker*-Sequenz aus drei Thymidinen. Daran gekoppelt war die Mutationsdomäne, bestehend aus 26 Basen. Das *mismatch* befand sich an 14. Stelle in der Domäne und damit in der zentralen Position. Die letzten beiden Basen am 3'-Ende des bifunktionellen Oligonukleotids waren zum Schutz vor Exonukleasen über Phosphorothioat-Bindungen verknüpft.

Das Oligonukleotid bi5gfp enthielt eine Triplehelix-bildende Domäne, die im Unterschied zum Oligonukleotid bi4gfp etwas länger war (16 Basen) und um 5 Basen versetzt an die Polypurinsequenz des Zielgens binden konnte. Die Mutationsdomäne war mit 33 Basen ebenfalls länger als die vergleichbare Domäne des Oligonukleotids bi4gfp. Das *mismatch* war an 27. Stelle nicht in der zentralen Position angeordnet. Die *Linker*-Sequenz zwischen beiden Domänen bestand wiederum aus drei Thymidinen und am 3'-Ende war das Oligonukleotid durch zwei Phosphorothioat-Bindungen vor Abbau durch Exonukleasen geschützt.

Das bifunktionelle Oligonukleotid bi6gfp entsprach, bis auf die fehlende *Linker*-Sequenz, in der Basenabfolge und den Modifizierungen dem Oligonukleotid bi5gfp.

Das Oligonukleotid MDgfp bestand ausschließlich aus einer Mutationsdomäne und enthielt keinen Triplehelix-bildenden Bereich. Zum Schutz vor Exonukleasen waren am 3'-Ende die letzten beiden der insgesamt 45 Basen über Phosphorothioat-Bindungen verknüpft. Das *mismatch* befand sich an Position 18.

#### 4.4.10 Transport von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden in den Zellkern

Die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden in Protoplasten und die nachfolgende Anreicherung im Kern wurde unter Verwendung von Kartoffel-Protoplasten untersucht. Protoplasten aus *A. thaliana* erwiesen sich aufgrund ihrer geringen Stabilität als ungeeignet. Es wurden mehrere Oligonukleotid-Varianten eingesetzt (s. Abb. 23). Erste Versuche wurden mit kurzen Oligonukleotiden durchgeführt, die nur aus der Triplehelix-bildenden Domäne bestanden und mit Rhodamin (Oligo3) bzw. TAMRA (Oligo9) gekoppelt waren. In weiteren Versuchen wurde das bifunktionelle Oligonukleotid bi5gfp in einer TAMRA-markierten Variante verwendet.

**Oligo3**      3' **ttTTCTTTCTCTCTCTTCCCTCTTCTC**-Rhodamin 5'

**Oligo9**      3' **ttTTCTTTCTCTCTCTTCCCTCTTCTC**-TAMRA 5'

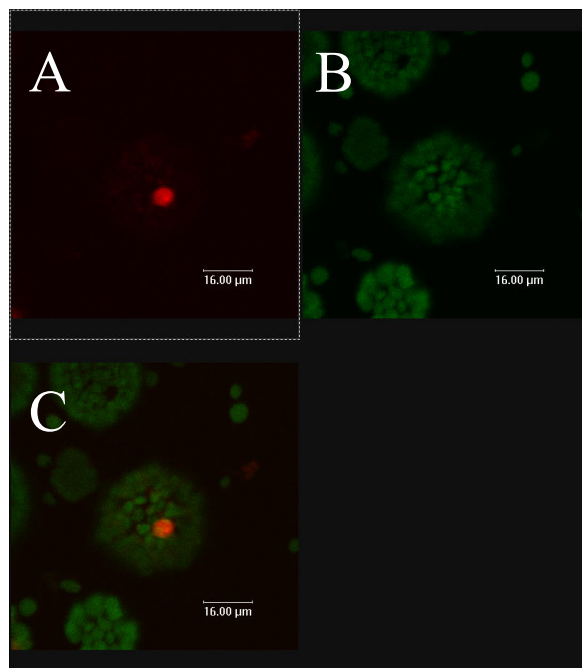
**bi5gfpT**      3' **ttTCTCTCTCTTCCCT**TTTGAAGAGGTTTGGTACCCATTTCTCTTGTTCAA-**TAMRA** 5'

**Abb. 23: Darstellung der verwendeten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide.** Die Oligonukleotide Oligo3 und Oligo9 bestehen aus dem 27 bp langen Triplehelix-bildenden Bereich (fett). Die Art der Fluoreszenz-Markierung unterscheidet sich (Rhodamin bzw. TAMRA). Das mit TAMRA markierte Oligonukleotid bi5gfpT enthält zusätzlich eine Mutationsdomäne (Normalschrift) und ist homolog zu dem für die *in situ*-Modifizierungsversuche verwendeten bifunktionellen Oligonukleotid bi5gfp. Beide Domänen sind durch eine *Linker*-Sequenz aus drei Thymidinen (TTT) miteinander verbunden. Kleinbuchstaben kennzeichnen zum Schutz vor 3'-Exonukleasen verwendete Phosphorothioat-Bindungen.

Die ersten Versuche wurden mit dem Rhodamin-markierten Oligonukleotid Oligo3 durchgeführt. Direkt nach der Elektroporation zeigten fluoreszenzmikroskopische Kontrollen der Proben einen im roten Bereich fluoreszierenden Hintergrund, der die Fluoreszenz in den Zellen stark überlagerte. Daraus ergab sich die Notwendigkeit einer Waschung der Protoplasten vor der Analyse. Durch Zugabe von 12 ml Glycin-Lösung zur Probe, anschließende 5 min Zentrifugation und Resuspendierung der Zellen in SKM-Medium konnten die überschüssigen fluoreszierenden Oligonukleotide effektiv aus der Lösung entfernt werden. Anschließend war eine Auswertung der Probe ohne störenden Hintergrund möglich.

In den Versuchen mit Oligo3 waren schon direkt nach der Waschung der Proben und der Vorbereitung auf dem Objektträger, also etwa 20 min nach der Transformation, viele Zellkerne durch eine rote Fluoreszenz markiert. Die Zahl der markierten Zellkerne nahm im Zeitraum von 4 Stunden weiter zu. Letztendlich waren im Durchschnitt aller Versuche mehr als 60 % der Zellkerne durch fluoreszierende Oligonukleotide rot markiert (s. Abb. 24).

**Abb. 24: Anreicherung von Rhodamin-markierten Oligonukleotiden (Oligo3) im Zellkern von Kartoffel-Protoplasten.** Aufnahme am CLSM ca. 1 h nach der Transformation der Protoplasten.  
Anregungswellenlänge: 543 nm  
Detektion:  
A: roter Kanal 570-605 nm  
B: grüner Kanal 650-690 nm  
C: Überlagerung beider Kanäle



Für die Wiederholung dieser Versuchsreihe standen leider keine identischen mit Rhodamin markierten Oligonukleotide zur Verfügung, da die Firma Sigma-Genosys ihr Produktprogramm geändert hatte. Als modifizierte Variante des Rhodamin wurde nunmehr TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-Rhodamin) für die Markierung von Oligonukleotiden im roten Fluoreszenzbereich angeboten. Aufgrund der sehr ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften des TAMRA-Moleküls wurden keine Schwierigkeiten bei der Wiederholung der oben beschriebenen Experimente erwartet.

Bei den folgenden Versuchen mit Oligo9 (TAMRA-Markierung) wurden einige Abweichungen zu den vorher gemachten Beobachtungen festgestellt.

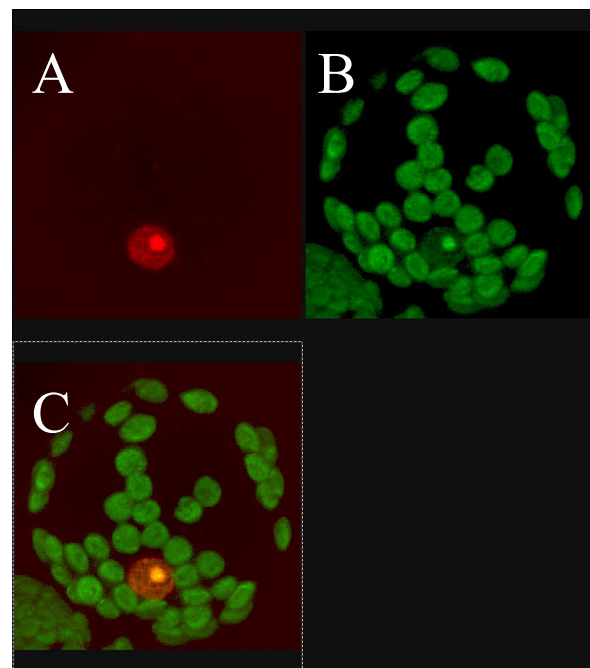
Die für die erfolgreiche Markierung von Zellkernen notwendige Menge von Oligonukleotiden war bei Verwendung von TAMRA als Fluoreszenzmarker höher als bei der Verwendung von Rhodamin. Es mussten pro Transformation 20 µg Oligonukleotid-DNA eingesetzt werden. Damit war zur Beobachtung des gleichen positiven Effekts mit TAMRA-Oligonukleotiden etwa die sechsfache Menge der vorher eingesetzten Rhodamin-Oligonukleotide notwendig, obwohl sich die Sequenzen der dabei eingesetzten Triplehelix-bildenden Oligonukleotide Oligo3 und Oligo9 sowie alle anderen Transformationsparameter nicht unterschieden.

Der Zeitraum von der Elektroporation der Zellen bis zur maximalen Markierung der Zellkerne mit fluoreszierenden Oligonukleotiden variierte zwischen den beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen. Die anfangs mit Oligo3 beobachtete Zeitspanne von ca. 20 min war bei der Verwendung von Oligo9 etwas verlängert, obwohl die Transformationsparameter unverändert waren.

Die unterschiedlichen Parameter bezüglich der eingesetzten DNA-Menge sowie der Zeit bis zur Anreicherung der Oligonukleotide im Zellkern sind offensichtlich nur auf die spezifischen Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzmoleküle zurückzuführen. Die positiven Ergebnisse der Versuche, nämlich eine effiziente Aufnahme der Triplehelix-bildenden Oligonukleotide in die Zellen und ihre relativ schnelle Wanderung in den Zellkern, wurden durch beide Varianten belegt.

Anschließend wurden Versuche mit dem TAMRA-markierten bifunktionellen Oligonukleotid bi5gfpT durchgeführt (s. Abb. 25). Ziel dieser Untersuchungen war, die Übertragbarkeit der mit den kurzen Oligonukleotiden erzielten Ergebnisse auf die längeren bifunktionellen Oligonukleotide zu überprüfen.

**Abb. 25: Anreicherung von TAMRA-markierten bifunktionellen Oligonukleotiden (bi5gfpT) im Zellkern von Kartoffel-Protoplasten.** Aufnahme am CLSM ca. 2 h nach der Transformation der Protoplasten.  
Anregungswellenlänge: 543 nm  
Detektion:  
A: roter Kanal 575-595 nm  
B: grüner Kanal 610-715 nm  
C: Überlagerung beider Kanäle



Die Versuche mit bifunktionellen Oligonukleotide (bi5gfp) und den kurzen Oligonukleotiden, die nur aus der Triplehelix-bildenden Domäne bestanden (Oligo3 und 9), führten zu vergleichbaren Resultaten. Sowohl die Aufnahme des bifunktionellen Oligonukleotids in die Protoplasten als auch die Anreicherung im Kern erfolgte vergleichbar zu den vorher untersuchten kurzen Oligonukleotiden.

Die Länge der verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen hatte somit im untersuchten Größenbereich keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

#### 4.4.11 Modifizierungsversuche mit bifunktionellen Oligonukleotiden

Für die Arbeiten zur Aktivierung des Modellgens wurden die drei Kartoffel-Linien TG10, TG11 und TG23 eingesetzt. Die Protoplasten aus *A. thaliana* erwiesen sich als zu instabil für die Elektroporation. Vor der Gewinnung von Mesophyllprotoplasten wurden die Kartoffel-Pflanzen vier bis sechs Wochen *in vitro* kultiviert. Die Gewinnung der Protoplasten erfolgte standardmäßig nach dem im Methodenteil (s. 3.2.3) beschriebenen Protokoll. Es wurden drei verschiedene bifunktionelle Oligonukleotide (bi4gfp, bi5gfp, bi6gfp) sowie die Mutationsdomäne allein (MDgfp) eingesetzt. Pro Ansatz wurden 0,5 Mio Protoplasten transformiert. Die verwendete Menge des jeweiligen bifunktionellen Oligonukleotids lag bei 20 µg. Während der kritischen Phase direkt nach der Transformation wurden die Proben für einige Minuten auf Eis inkubiert, um möglichst vielen der durch die Elektroporation geschädigten Protoplasten die Regeneration der Zellmembran zu ermöglichen. Danach wurden zu jeder Probe 4 ml SKM-Medium gegeben und die Lösung in eine kleine Petrischale überführt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 24°C.

Einige Proben wurden vor der Transformation bis zu 72 h präinkubiert, um eine für die Effizienz der Methode günstigere Zellzyklusphase zu erreichen (Zhao *et al.*, 2001). Die weitere Behandlung erfolgte nach Standardprotokoll. Andere Proben wurden nach der Transformation einer erhöhten Temperatur ausgesetzt (*heat shock*), um DNA-Reparaturprozesse zu induzieren. Dabei wurden die Protoplasten für 5 min bei 32°C inkubiert. Anschließend wurden sie wie üblich weiterkultiviert.

Nach 24, 48 und 72 h wurden aus den Petrischalen Aliquots entnommen und die Protoplasten am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Probenahme erfolgte über den angegebenen Zeitraum, bis das Probenvolumen vollständig analysiert war.

Mit dem bifunktionellen Oligonukleotid bi4gfp wurden insgesamt 7 Protoplasten-Transformationen unter Standardbedingungen durchgeführt. Zusätzlich erfolgten 14 Versuche mit Präinkubation der Protoplasten, *heat shock* oder beidem in Kombination. Unter den insgesamt eingesetzten 11,5 Millionen Protoplasten konnte kein positives Ereignis detektiert werden (s. Tab. 5).

**Tab. 5: Übersicht über die mit dem bifunktionellen Oligonukleotid bi4gfp durchgeführten Modifizierungsversuche**

	Versuche Standard- bedingungen	Versuche mit Präin- kubation	Versuche mit <i>heat shock</i>	Versuche mit Präinkubation und <i>heat shock</i>	Ergebnis
<b>TG10</b>	1	-	1	1	-
<b>TG11</b>	3	4	1	1	-
<b>TG23</b>	3	4	1	1	-



Mit dem bifunktionellen Oligonukleotid bi5gfp erfolgten insgesamt 8 Protoplasten-Transformationen unter Standardbedingungen. Zusätzlich wurden 18 Versuche mit Präinkubation der Protoplasten, *heat shock* oder beidem in Kombination durchgeführt. Unter den insgesamt eingesetzten 13 Millionen Protoplasten konnte kein positives Ereignis detektiert werden (s. Tab. 6).

**Tab. 6:** Übersicht über die mit dem bifunktionellen Oligonukleotid bi5gfp durchgeführten Modifizierungsversuche

	Versuche Standard- bedingungen	Versuche mit Präin- kubation	Versuche mit <i>heat shock</i>	Versuche mit Präinkubation und <i>heat shock</i>	Ergebnis
<b>TG10</b>	2	-	2	1	-
<b>TG11</b>	4	5	2	1	-
<b>TG23</b>	2	5	1	1	-

Mit dem bifunktionellen Oligonukleotid bi6gfp wurden insgesamt 3 Protoplasten-Transformationen unter Standardbedingungen durchgeführt. Zusätzlich erfolgten 10 Versuche mit Präinkubation der Protoplasten, *heat shock* oder beidem in Kombination. Unter den insgesamt eingesetzten 6,5 Millionen Protoplasten konnte kein positives Ereignis detektiert werden (s. Tab. 7).

**Tab. 7:** Übersicht über die mit dem bifunktionellen Oligonukleotid bi6gfp durchgeführten Modifizierungsversuche

	Versuche Standard- bedingungen	Versuche mit Präin- kubation	Versuche mit <i>heat shock</i>	Versuche mit Präinkubation und <i>heat shock</i>	Ergebnis
<b>TG10</b>	1	-	2	2	-
<b>TG11</b>	2	-	1	1	-
<b>TG23</b>	-	2	1	1	-

Mit dem Oligonukleotid MDgfp erfolgten insgesamt 3 Protoplasten-Transformationen unter Standardbedingungen. Zusätzlich wurden 16 Versuche mit Präinkubation der Protoplasten, *heat shock* oder beidem in Kombination durchgeführt.

In einem Ansatz mit Protoplasten der Linie TG11 trat mit der Variante mit *heat shock* ein Protoplast mit gfp-Fluoreszenz auf. In den nachfolgend unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen mit Protoplasten der gleichen Linie und Protoplasten anderer Linien konnte keine weitere gfp-Fluoreszenz detektiert werden. Damit blieb es in den Versuchen mit der Mutationsdomäne insgesamt bei einem positiven Ereignis unter 4,5 Millionen eingesetzten Protoplasten (s. Tab. 8).

**Tab. 8:** Übersicht über die mit dem Oligonukleotid MDgfp durchgeführten Modifizierungsversuche. Der fluoreszierende Protoplast trat in einer *heat shock*-Variante ohne Präinkubation auf.

	<b>Versuche Standard- bedingungen</b>	<b>Versuche mit Präin- kubation</b>	<b>Versuche mit <i>heat shock</i></b>	<b>Versuche mit Präinkubation und <i>heat shock</i></b>	<b>Ergebnis</b>
<b>TG10</b>	1	-	2	2	-
<b>TG11</b>	2	-	3	1	1 fluo. PP
<b>TG23</b>	-	2	4	2	-

Für alle Oligonukleotide und alle verwendeten transgenen Linien zusammen wurden 39,5 Millionen Protoplasten für die Transformationen eingesetzt. Es konnte insgesamt nur ein fluoreszierender Protoplast gefunden werden.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass aufgrund der großen Zahl transformierter Zellen auch ein Mutationsereignis als Ursache für die einmalig aufgetretene Aktivierung des Modellgens nicht ausgeschlossen werden kann.

## 4.5 Das Modellgensystem aus bar-Gen und 39 bp-gbssI-Insert

### 4.5.1 Erstellen von bar-Modellgenen mit 39 bp-gbssI-Insert

Für die Konstruktion eines selektierbaren Modellgens wurde nur der 27 bp lange Polypurinbereich des gbssI-Gens mit den für die Ligation notwendigen angefügten *Nco*I-sites verwendet. Diese insgesamt 39 bp lange Sequenz wurde mit dem Bialaphos-Resistenzgen (*bar*) aus dem Binärvektor pLH7000 (Hausmann u. Töpfer, 1999) fusioniert (s. Abb. 26). Die Expressionskassetten der im pLH7000 erstellten Modellgen-Varianten (Kontroll- und Testgen) wurde in die *multiple-cloning-site* des Vektors pLH9000 (Hausmann u. Töpfer, 1999) eingefügt. Nur fehlerfrei sequenzierte Konstrukte wurden für die Pflanzentransformation verwendet.

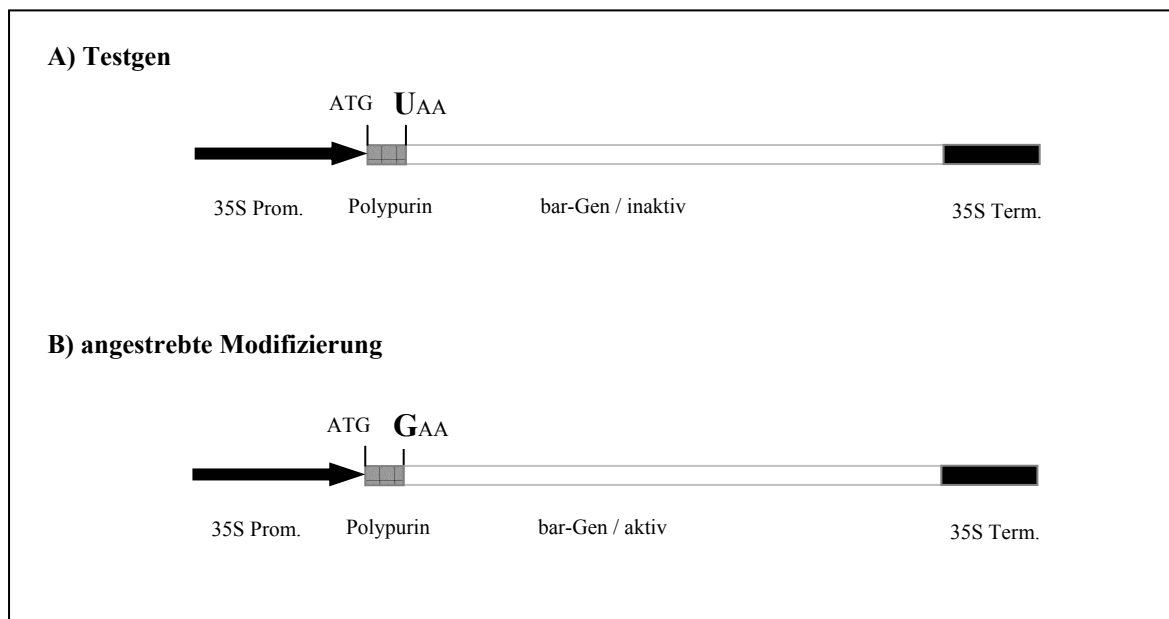


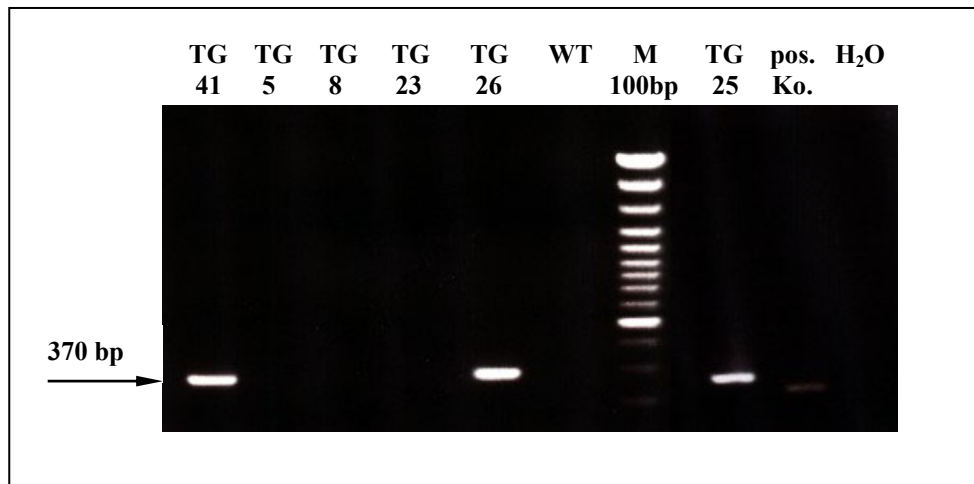
Abb. 26: Modell der Testgenvariante des Fusionsgens bestehend aus dem 39 bp-Insert und dem *bar*-Gen aus pLH7000

### 4.5.2 Erstellen transgener Pflanzen mit dem bar-Modellgen

Die fertiggestellten und sequenzierten Binärvektoren mit den beiden *bar*-Modellgenvarianten (Kontroll- und Testgen) wurden für Kartoffel-Transformationen eingesetzt. Es wurden eine Transformation mit dem KG-Konstrukt und zwei Transformationen mit dem TG-Konstrukt durchgeführt. Dabei wurden 177 bzw. 265 Internodien verwendet und insgesamt 19 KG-Linien und 37 TG-Linien auf Selektionsmedium mit Kanamycin regeneriert. Davon erwiesen sich 4 KG-Linien und 11 TG-Linien nach der PCR-Testung als transgen. Die 5-10 mm langen Sprosse wurden vom Kallus getrennt und in einzelne Stecklinge zerteilt. Jeweils ein Steckling wurde auf Medium mit Phosphinothricin (PPT) gesetzt. Die restlichen ein bis zwei Stecklinge wurden als Ausgangsmaterial für die entsprechende transgene Linie auf selektionsfreiem Medium kultiviert. Die KG-Linien zeigten auf Medium mit 2,5 µg PPT/ml, im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen auf Medium ohne PPT, keine Verzögerung der Wurzelbildung oder des Sprosswachstums. Der eingefügte kurze Polypurinabschnitt führte zu keiner Funktionsbeeinträchtigung des *bar*-Modellgens. Die Stecklinge von Testgen-Linien bewurzelten nicht und zeigten auch kein Sprosswachstum. Damit nahm ich an, dass die Grundvoraussetzungen für die Arbeit mit dem *bar*-Selektionssystem gegeben waren.

#### 4.5.3 Transkriptionsanalyse transgener Kartoffel-Linien mittels RT-PCR

Um stark exprimierende Linien für die weiteren Arbeiten auszuwählen, wurde wiederum die Methode der Reversen Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR) angewendet. Von Testgenlinien wurde RNA extrahiert und anschließend gleiche Mengen RNA als Template für die RT-PCR eingesetzt. Die Linien TG25, TG26 und TG41 wurden aufgrund starker Signale für die Modifikations- und Regenerationsversuche ausgewählt (s. Abb. 27).



**Abb. 27: RT-PCR von Kartoffel-TG-Linien.** Gleiche Ausgangsmengen RNA (100 ng) wurden für eine *One-Step* RT-PCR eingesetzt. Es wurde ein 370 bp Fragment des bar-Gens amplifiziert.

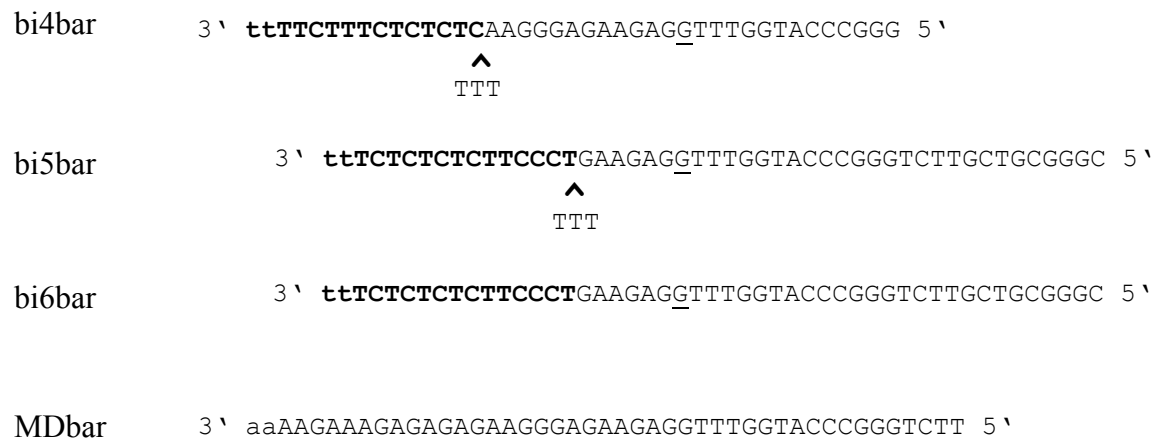
#### 4.5.4 Bifunktionelle Oligonukleotide für *in situ*-Versuche mit dem bar-Modellgen

Für das Modellgen bestehend aus dem Polypurinabschnitt des gbssI-Gens und dem bar-Gen aus pLH7000 wurden bifunktionelle Oligonukleotide entworfen (s. Abb. 28). Die Triplehelix-bildende Domäne entsprach dem Pyrimidin-Typ. Die Sequenz war aus Thymidin und Cytosin aufgebaut und konnte in paralleler Orientierung an den Polypurinbereich der Zielsequenz binden. Anstelle des unveränderten Cytosins wurde 5-Methylcytosin eingesetzt. Es wurden analog zum gfp-Modellgen drei Varianten bifunktioneller Oligonukleotide und die Mutationsdomäne allein verwendet. Der Aufbau der Oligonukleotide entsprach dem der gfp-Oligonukleotide mit Ausnahme der zur Mutationsdomäne komplementären bar-Gensequenz.

A)



B)



**Abb. 28:** A) Sequenzausschnitt des bar-Modellgens. Der zur Triplehelix-Bildung geeignete Polypurinbereich ist fett dargestellt. Das zu modifizierende Stop-Codon vor dem Beginn der bar-Sequenz ist rot dargestellt.

B) Darstellung der zur *in situ*-Modifizierung verwendeten bifunktionellen Oligonukleotide bi4bar, bi5bar und bi6bar sowie der reinen Mutationsdomäne (MDbar). Die Triplehelix-bildenden Domänen sind fett gekennzeichnet. Die Mutationsdomänen sind in Normalschrift dargestellt. Im Fall von bi4bar und bi5bar sind beide Domänen durch eine *Linker*-Sequenz aus drei Thymidinen (TTT) miteinander verbunden. Die zur Zielsequenz fehlpaarende Base ist unterstrichen. Kleinbuchstaben kennzeichnen zum Schutz vor 3'-Exonukleasen verwendete Phosphorothioat-Bindungen.

#### 4.5.5 Modifizierungsversuche mit bifunktionellen Oligonukleotiden

Die aufgrund der RT-PCR-Ergebnisse ausgewählten drei Linien wurden für die *in vitro*-Kultivierung umfangreich vermehrt. Nach etwa vier bis sechs Wochen dienten die Pflanzen der Protoplastengewinnung. Jeweils 0,5 Millionen Protoplasten wurden für eine Transformation eingesetzt. Protoplasten der Linien TG26 und TG41 wurden mit den vier Oligonukleotid-Varianten bi4bar, bi5bar, bi6bar und MDbar elektroporiert. Protoplasten der Linie TG25 wurden mit den Oligonukleotiden bi4bar und bi5bar elektroporiert (s. Tab. 9). Nach der Elektroporation wurden die Protoplasten in Alginat eingebettet und selektionsfrei in SKM-Medium bei Dunkelheit bis zum Mikrokalli-Stadium regeneriert. Nach einer kurzen Übergangsphase unter Lichteinfluss wurden die leicht ergrünten Kalli aus dem Alginat befreit und auf SKM-Festmedium mit 2,5 µg/ml Phosphinothricin weiterkultiviert. Zur Erhaltung des

Selektionsdruckes und zur Förderung des Wachstums wurden die Kalli 14-tägig auf frisches Medium umgesetzt.

**Tab. 9: Übersicht über die mit Protoplasten aus transgenen bar-Modellgen-Pflanzen durchgeführten Modifizierungsversuche und die Zahl der daraus regenerierten Kalli**

Linie	Versuche mit bi4bar	Versuche mit bi5bar	Versuche mit bi6bar	Versuche mit MDbar	Versuche insgesamt	Anzahl reg. Kalli
TG41	10	8	8	6	32	59.856
TG26	7	7	5	6	25	40.173
TG25	1	1	-	-	2	2.720

Die große Zahl der auf PPT-haltigem Medium regenerierten Kalli und das Ausbleiben einer Selektion im weiteren Kultivierungsverlauf führten zu dem Entschluss, die Resistenzeigenschaften der TG-Linien auf PPT-haltigem Medium nochmals zu untersuchen. Dazu wurden im Unterschied zur ersten Resistenztestung vor den Modifizierungsversuchen (s. 4.5.2) Stecklinge von voll entwickelten photosynthetisch aktiven Pflanzen aus *in vitro*-Kultur verwendet. Die Versuche ergaben, dass die Ausgangslinien TG25, TG26 und TG41 auf Medium mit 2,5 µg/ml PPT im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen ohne Verzögerung bewurzeln und sich normal weiterentwickelten. Zur weiteren Klärung der Expressionsverhältnisse in den eigentlich inaktiven TG-Linien wurde eine Proteinuntersuchung mittels ELISA durchgeführt.

#### 4.5.6 Expressionsanalyse transgener Kartoffel-Linien mittels BAR-ELISA

Der Nachweis des BAR-Proteins erfolgte mit dem ELISA-Kit für das PAT-Protein der Firma Steffens (Ebringen) (s. 3.13). Für die Untersuchungen wurde Blattmaterial von jungen Gewächshauspflanzen verwendet. Der ELISA-Test wurde mit den gleichen Pflanzen zweimal im Abstand von einer Woche durchgeführt (s. Tab. 10)

**Tab. 10: BAR-ELISA-Werte transgener Kartoffel-Linien**

Linie	1. ELISA	2. ELISA
KG5	0,061	0,069
KG33	0,032	0,010
TG25	0,048	0,045
TG26	0,116	0,106
TG41	0,085	0,132
WT	0,018	0,015

Das BAR-Protein konnte sowohl in KG- als auch in TG-Linien nachgewiesen werden. Der mehrfach wiederholte ELISA-Test ergab jeweils unterschiedliche Extinktionswerte innerhalb einer untersuchten Linie. Auch die Verhältnisse der Linien untereinander, insbesondere zwischen TG- und KG-Linien, waren nicht reproduzierbar. Die sehr niedrigen ELISA-Werte lassen keine quantitativen Vergleiche zwischen den Linien zu.

## 5 Diskussion

### 5.1 Bindungsfähigkeit von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden

Am Beginn der Arbeiten wurden die Bindungseigenschaften der entwickelten Oligonukleotide an die Zielsequenz untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei die Effizienz der Triplehelix-Bildung, die Sequenzspezifität und die Möglichkeit einer kovalenten Bindung des Oligonukleotids an die DNA-Doppelhelix mit Hilfe von Psoralen. Die Untersuchungen wurden in einem zunehmend komplexeren Sequenzumfeld zunächst an kurzen linearen DNA-Fragmenten und später an isolierter genomischer DNA durchgeführt.

#### 5.1.1 Studien an linearer Ziel-DNA mit Polypurinbereichen

Mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten lassen sich eindeutige Aussagen über die Ausbildung von Triplehelices machen. Dabei wird nach einer *in vitro* durchgeführten Hybridisierung zwischen Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden und einer Zielsequenz das Laufverhalten von Triplehelices im Vergleich zu ungebundener doppelsträngiger DNA betrachtet. Vorteil dieser Methode ist der direkte Nachweis der Triplehelixbildung durch Retardation der entsprechenden Bande im Agarosegel. Mit Hilfe von Oligonukleotiden verschiedener Sequenzen können Aussagen über die Sequenzspezifität der Reaktion abgeleitet werden. Durch die Änderung von Pufferzusammensetzungen, Temperatur und Dauer der Hybridisierung kann der Einfluss verschiedener Umgebungsparameter untersucht werden.

Hilfreich für einen Nachweis der Triplehelices im Agarosegel kann die Fixierung der gebildeten Struktur durch Psoralen sein. Das Molekül interkaliert in den DNA-Doppelstrang und bildet nach UVA-Bestrahlung eine kovalente Bindung des Oligonukleotids mit der Doppelhelix aus. Von Perkins *et al.* (1999) konnte gezeigt werden, dass 5'-ApT-3' bzw. 5'-TpA-3'-Dinukleotide bis zu sieben Basen entfernt von der Triplehelix-Zielsequenz effizient gebunden werden. Allerdings wird die Häufigkeit der Bindung mit wachsendem Abstand zur Zielsequenz immer geringer. Aus diesem Grunde wurde für alle Versuche in dieser Arbeit ein 5'-TpA-3'-Dinukleotid im direkten Anschluss an die Polypurinregion zur Psoralenbindung genutzt.

Durch meine Versuche konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Psoralen für den Nachweis von Triplehelices durch Gelretardation nicht notwendig ist. Im verwendeten sauren Laufpuffer nach Gamper *et al.* (1999) waren die Triplehelix-Strukturen auch ohne kovalente Bindungen stabil. Nach den ersten erfolgreichen Versuchen ohne Psoralen wurde deshalb auf ein UV-*crosslinking* verzichtet.

Als Zielsequenz für die *in vitro*-Hybridisierungsversuche wurde der 27 Basen lange Polypurinstrang aus den Modellgenen verwendet. Das eingesetzte Triplehelix-bildende Oligonukleotid Retard war ebenfalls 27 Basen lang. Ein längeres Oligonukleotid mit einer an den Triplehelix-bildenden Bereich gekoppelten Mutationsdomäne wurde nicht untersucht. Durch Kontrollansätze mit großen Sequenzunterschieden zwischen dem Triplehelix-bildenden Oligonukleotid und der Zielsequenz erschienen Wechselwirkungen zwischen der Mutationsdomäne und der Zielsequenz als unwahrscheinlich.

Von Perkins *et al.* (1999) wurde die doppelsträngige Ziel-DNA durch Hybridisierung zweier kurzer einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide erzeugt. Diese kurzen DNA-Doppelstränge zeigen eine Triplehelix-Bildung wesentlich deutlicher als große DNA-Fragmente oder gar Plasmid-DNA. Aus diesem Grunde wurden meine Untersuchungen zur *in vitro*-Hybridisierung ebenfalls mit linearen DNA-Doppelsträngen durchgeführt. Diese wurden vor jedem Versuch durch Hybridisierung der entsprechenden komplementären Einzelstränge erzeugt. Diese Methode stellt beliebige Mengen doppelsträngiger Ziel-DNA zur Verfügung und ist einfach und zeitsparend. Andere Methoden, wie z.B. die Spaltung eines zielsequenzhaltigen Plasmids (Vasquez *et al.*, 1998), sind wesentlich zeitaufwändiger und bringen einen unspezifischen DNA-Hintergrund mit in die Probe.

In meiner Arbeit wurden für die Kontrollansätze zur Überprüfung der Sequenzspezifität die Basenfolgen der jeweiligen Ziel-DNA verändert. Für die Variationen wurde die Ziel-DNA gewählt, weil nichtmodifizierte DNA-Oligonukleotide im Vergleich zu Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden mit modifizierten Basen wesentlich preisgünstiger sind. Die Aussagen der Versuchsergebnisse über die Sequenzspezifität der Bindung bleiben davon unbeeinflusst.

Zum Nachweis der Triplehelices in Agarose- bzw. Acrylamidgelen wurden in vielen Arbeiten entweder die DNA-Doppelhelices oder die Triplehelix-bildenden Oligonukleotide radioaktiv markiert (z.B. Gamper *et al.*, 1998; Perkins *et al.*, 1999). Wahrscheinlich wurde diese Art der Markierung aufgrund der hohen Sensitivität im Nachweis verwendet. Dagegen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass unter den beschriebenen Bedingungen und den erreichten Effizienzen der Nachweis von Triplehelices mit einem interkalierenden DNA-Farbstoff (Gelstar<sup>®</sup>) problemlos möglich war und somit auf den Einsatz von Radioaktivität verzichtet werden konnte.

Die Effizienz der Hybridisierung zwischen Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden und ihren Zielsequenzen wurde in mehreren Arbeiten untersucht (z.B. Vasquez *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 1999). Zur Quantifizierung wurden dafür radioaktive Markierungen an den Oligonukleotiden oder an der Ziel-DNA verwendet. Zur Auswertung wurden nach der Gelelektrophorese die Intensitäten der retardierten Banden gemessen und das Verhältnis zum ungebundenen DNA-Rest berechnet. Vasquez *et al.* (1995) untersuchten u.a. die Triplehelix-Bildung in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Oligonukleotid-Konzentrationen. Bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M hatten nach etwa einer Stunde Hybridisierungsdauer fast 100 % der Oligonukleotide Triplehelices gebildet. Auch bei einer Oligonukleotid-Konzentration von  $10^{-8}$  M wurde nach ca. acht Stunden ein Maximum von über 90 % erreicht.

Die von Perkins *et al.* (1999) untersuchten Oligonukleotide mit gekoppeltem Psoralen wiesen, in Abhängigkeit von der *Linker*-Sequenz zwischen Oligonukleotid und Psoralen, sehr unterschiedliche Effizienzen in der Photoadduktbildung auf. Bei diesen Untersuchungen wurde nach der Gelelektrophorese die Menge der gebildeten Photoaddukte mittels Autoradiographie ermittelt. Dieses Ergebnis wurde dann auf die gesamte Menge der gebildeten Triplehelices bezogen. Die Effizienzen der Photoadduktbildung lag bei zwei verschiedenen Zielsequenzen mit einer 5'-TpA-3' bzw. 5'-ApT-3'-Folge im direkten Übergang von der Triplehelix zur Doppelhelix bei 56 % und 65 %.

In einer Arbeit mit Säugerzellen wurden Effizienzen der Triplehelix- und Photoaddukt-Bildung von mehr als 90 % berichtet (Giovannangeli *et al.*, 1997). Bei den hierbei verwendeten Oligonukleotiden handelte es sich ebenfalls um solche mit Psoralen-Modifizierung. Die Triplehelix-Bildung fand an isolierter genomischer DNA aus Säugerzellen statt, in der eine HIV-Zielsequenz integriert war.



Die genannten Arbeiten zeigen, dass unter geeigneten Bedingungen sowohl die Triplehelix-Bildung als auch die anschließende Photoaddukt-Bildung nach Psoralen-Quervernetzung sehr effizient erfolgen können. Die kovalente Bindung der Triplehelix-bildenden Oligonukleotide an den Doppelstrang der Ziel-DNA ermöglicht zudem einen guten Nachweis der gebildeten Struktur.

Auch in den von mir durchgeführten Versuchen bildete ein großer Anteil von mehr als 99 % der für die *in vitro*-Hybridisierungen eingesetzten Ziel-DNA Triplehelices aus (s. 4.2.2).

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der *in vitro*-Hybridisierungen in Abhängigkeit von den verschiedenen Bedingungen im Detail diskutiert werden.

#### **5.1.1.1 Einfluss des pH-Wertes**

Die ersten *in vitro*-Hybridisierungen wurden nach Perkins *et al.* (1997) in einem Puffer mit neutralem pH-Wert durchgeführt. Die erfolgreiche Ausbildung von Triplehelices konnte in Übereinstimmung mit der genannten Veröffentlichung gezeigt werden. Um die Versuchsbedingungen dem pH-Millieu pflanzlicher Zellen anzunähern, wurden die späteren Hybridisierungsversuche bei einem pH-Wert von 6,0 durchgeführt. Die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers blieb unverändert. Auch die bei saurem pH-Wert durchgeführten Versuche zeigten unverändert gute Ergebnisse. Die Effizienz der Hybridisierung und die Sequenzspezifität wurden nicht beeinträchtigt (s. S. 49, Abb. 9). Diese Resultate waren ein wichtiger Schritt zur weiteren Anpassung des Systems an praxisrelevante Bedingungen.

#### **5.1.1.2 Einfluss der Hybridisierungstemperatur**

In den ersten Versuchen wurde die in den zitierten Arbeiten beschriebene Hybridisierungstemperatur von 37°C übernommen. Da die Grundlagen der Anwendung Triplehelix-bildender Oligonukleotide im animalen System erarbeitet wurden, leitet sich diese relativ hohe Hybridisierungstemperatur von den Kultivierungsbedingungen für tierische Zellkulturen ab. Nachdem bei dieser Temperatur sequenzspezifische Bildungen von Triplehelices gezeigt werden konnten, wurden in den folgenden Versuchen die Hybridisierungstemperaturen zuerst auf 28°C und später auf 21°C abgesenkt. Die letztgenannte Temperatur liegt im Bereich der üblichen Kultivierungsbedingungen pflanzlicher Zell- und Gewebekulturen und ist damit für die Anwendung in der Praxis relevant. Die Effizienz der Triplehelix-Bildung wurde durch die schrittweise Absenkung der Hybridisierungstemperatur nicht verringert. Dies war ohnehin nicht zu erwarten, da die Hybridisierung von DNA-Strängen aufgrund thermodynamischer Gesetzmäßigkeiten bei niedrigen Temperaturen schneller erfolgt. Andererseits bestand unter diesen Bedingungen die Gefahr einer Zunahme unspezifischer Wechselwirkungen zwischen den Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden und den als Negativ-Kontrollen verwendeten DNA-Doppelsträngen mit durchmischter Sequenz. Die Ergebnisse der *in vitro*-Hybridisierungen bei Raumtemperatur widerlegen diese eventuell zu erwartende Zunahme unspezifischer Wechselwirkungen. Das verwendete Triplehelix-System arbeitete weiterhin effizient und sequenzspezifisch (s. S. 50, Abb. 10). Fehlhybridisierungen wurden nicht gefunden.

### 5.1.1.3 Einfluss der Hybridisierungsdauer

Die Dauer der *in vitro*-Hybridisierung zwischen doppelsträngiger Ziel-DNA und Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden wurde in den bisher veröffentlichten Arbeiten sehr unterschiedlich gewählt. So wurden die Hybridisierungsansätze von Perkins *et al.* (1998 u. 1999) für 72 h inkubiert, bevor das Nachweisverfahren für die Triplehelices durchgeführt wurde. Vasquez *et al.* (1995) inkubierten ihre Hybridisierungsansätze aus Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden und Plasmid-DNA für 15 h. Auch bei dieser verkürzten Hybridisierungsdauer lief der Prozess der Triplehelix-Bildung nahezu vollständig ab. Die Hybridisierung mit kurzer linearer Ziel-DNA erreichte bei einer Oligonukleotid-Konzentration von  $10^{-7}$  M bereits nach einer Stunde ihr Maximum. Längere Inkubationszeiten bis 16 Stunden ergaben keine weitere Erhöhung der Ausbeute.

Die zuletzt zitierte Arbeit legt den Schluss nahe, dass zumindest bei hohen Oligonukleotid-Konzentrationen die Ausbildung der Triplehelices bereits nach relativ kurzer Zeit abgeschlossen sein kann.

Da im Zytoplasma mit einem bald einsetzenden Abbau von Oligonukleotiden durch Exonukleasen gerechnet werden muss, wurde in der vorliegenden Arbeit mit relativ kurzen Hybridisierungszeiten von maximal 2 Stunden gearbeitet. Diese Zeitspanne scheint im Hinblick auf Abbauprozesse an den Oligonukleotiden und relativ rasch nach der Triplehelix-Bildung einsetzende Reparatur- und Rekombinationsprozesse an der genomischen DNA praxisrelevant zu sein. Die Ergebnisse der *in vitro*-Hybridisierungsversuche zeigen, dass diese Hybridisierungsdauer ausreichend für eine effiziente Ausbildung von Triplehelices ist und damit die Voraussetzungen für eine *in vivo*-Anwendung gegeben sind (s. S. 51, Abb. 11).

### 5.1.2 Studien an genomischer Ziel-DNA mit Polypurinbereichen

Entscheidend für die beabsichtigte sequenzmodifizierende Wirkung Triplehelix-bildender Oligonukleotide ist, neben der bereits diskutierten Anreicherung im Zellkern, ihre Bindung an die Zielsequenz. Erst die Ausbildung der Triplehelix liefert die notwendigen Voraussetzungen für die nachfolgend einsetzenden Reparatur- bzw. Rekombinationsprozesse, die letztendlich zu den gewünschten Veränderungen in der Zielgensequenz führen.

Die meisten Nachweise spezifischer Bindungen von Oligonukleotiden an ihre Zielsequenzen sind methodisch recht aufwändig. Eine Möglichkeit besteht in der Hemmung eines Restriktionsenzym durch die Ausbildung einer Triplehelix an der Erkennungssequenz. Giovannangeli *et al.* (1997) wiesen ein durch die Restriktionsspaltung entstandenes Fragment durch Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde nach. Diese Nachweismethode konnte aufgrund fehlender geeigneter Restriktionsschnittstellen im Rahmen meiner Arbeiten nicht angewendet werden.

Eine weitere Nachweismethode für Triplehelices basiert auf *Primerextension* und PCR. Belousov *et al.* (1998) konnten mit Hilfe dieser Technik die Effizienz der Triplehelix-Bildung an einer 12 bp langen Polypurinsequenz eines menschlichen Rezeptorgens quantifizieren. Aufgrund des hohen methodischen Aufwandes hat dieses Nachweisverfahren bisher keine breite Anwendung gefunden und wurde deshalb auch in meinen Versuchen nicht eingesetzt.

Eine neue von Besch *et al.* (2002) entwickelte Nachweismethode basiert auf zweifach modifizierten Oligonukleotiden. Ein an das Triplehelix-bildende Oligonukleotid gekoppeltes Psoralen-Molekül ermöglicht nach Bestrahlung mit UVA eine Quervernetzung mit dem DNA-Doppelstrang. Die zweite Modifizierung, ein gekoppeltes Biotin-Molekül, ermöglicht die spezifische Separation des gebundenen DNA-Abschnitts mit Hilfe magnetischer mit Streptavidin beschichteter Partikel. Das so abgetrennte DNA-Fragment kann in einer nachfolgenden PCR identifiziert werden. Der Vorteil dieser neuen Methode besteht in ihrer

breiten Anwendbarkeit. Die Triplehelix-Bindungsregion muss keine zusätzlichen Anforderungen erfüllen. Dadurch ist der Nachweis einer Triplehelix prinzipiell an jeder beliebigen Zielsequenz möglich. Zudem ist der experimentelle Aufwand geringer als bei den vorher beschriebenen Methoden. Mit Hilfe dieser Methode gelang es Besch *et al.* (2002), die sequenzspezifische Bindung von Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden an isolierter genomischer DNA und in intakten Zellkernen humaner Zellen nachzuweisen. Die Sequenzspezifität wurde mit Oligonukleotiden durchmischter Sequenz, die keine Bindung zeigten, nachgewiesen.

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde auch in der vorgestellten Arbeit die Methode der magnetischen Separation zum Nachweis der Triplehelix-Bildung an genomischer DNA verwendet.

Das von Besch *et al.* (2002) veröffentlichte Protokoll musste dafür in einigen Punkten modifiziert werden. Zur Spaltung der isolierten genomischen DNA wurde das Restriktionsenzym *HindIII* eingesetzt. Die dadurch erzeugten Fragmente enthielten die Zielregion für die Triplehelixbildung und waren mit einer Größe von ca. 2,5 kb für die Aufreinigung mit Streptavidinbeads geeignet. Die starke unspezifische Bindung von DNA an die Kunststoffoberfläche der Streptavidinbeads wurde als wesentliches experimentelles Problem erkannt. Die von Besch *et al.* (2002) empfohlene Präinkubation mit Heringssperma-DNA zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen hat sich in meinen Versuchen als nicht ausreichend erwiesen. Erst eine Präinkubation der Streptavidinbeads in einem Puffer mit 5 % BSA verhinderte unspezifische Bindungen ausreichend. Auch die Inkubation der Triplehelix-Lösung mit den Streptavidinbeads wurde in Gegenwart von 5 % BSA durchgeführt. Zusätzlich wurden die Waschbedingungen nach der Bindung der biotinmarkierten DNA restriktiver gestaltet. Es wurde ein Waschpuffer mit 0,05 % Tween verwendet und die Zahl der Waschzyklen auf vier erhöht. Zudem wurde das Reaktionsgefäß nach dem ersten Waschschrift gewechselt, um an der Oberfläche des Gefäßes anhaftende DNA-Kontaminationen auszuschließen.

Aufgrund des methodisch anspruchsvollen Nachweisverfahrens wurde mit der maximal möglichen Länge des Triplehelix-bildenden Oligonukleotids von 27 Basen gearbeitet, um ideale Bindungsbedingungen zu gewährleisten. Die Verwendung bifunktionaler Oligonukleotide für die Methode der magnetischen Separation wurde bisher nicht beschrieben. Deshalb wurde in den von mir durchgeführten Versuchen ausschließlich das Triplehelix-bildende Oligonukleotid PsoBio6 eingesetzt.

Unter den erarbeiteten modifizierten Bedingungen wurde die Triplehelix-Bildung exemplarisch an genomischer DNA der Linie TG11 untersucht. Die sequenzspezifische Ausbildung einer Triplehelix konnte in der abschließenden PCR nachgewiesen werden. Daneben ergab aber auch die Kontrolle mit einem Oligonukleotid durchmischter Sequenz ein schwaches PCR-Produkt (s. S. 62, Abb. 21). Möglicherweise wird durch die relativ hohe Konzentration der Triplehelix-bildenden Oligonukleotide im *in vitro* - Hybridisierungsansatz die Ausbildung unspezifischer Bindungen gefördert. Auch in den Untersuchungen von Besch *et al.* (2002) traten schwache PCR-Produkte in den Kontrollansätzen auf. Durch methodische Änderungen wie eine Verkürzung der Hybridisierungsdauer oder die Absenkung der Oligonukleotid-Konzentration könnte möglicherweise die Sequenzspezifität der Triplehelix-Bildung erhöht werden.

Als grundsätzlicher Nachteil der Methode der magnetischen Separation erwies sich in meinen Arbeiten deren hohe Störanfälligkeit. Die größte Herausforderung stellte das effiziente Abtrennen nicht gebundener Ziel-DNA in den Waschsritten nach der Hybridisierung dar. Da im ersten Schritt der Methode, der Hybridisierung der Ziel-DNA mit den Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden, große Mengen DNA eingesetzt werden, besteht das Risiko einer

unspezifischen Bindung dieser DNA an die Kunststoffoberflächen des Reaktionsgefäßes und der Streptavidinbeads. Im Extremfall kann eine einzige nicht eliminierte Kopie des Zielgens in der abschließenden PCR amplifiziert werden und somit zu einem falsch-positiven Ergebnis führen.

Eine methodische Alternative zum problematischen Nachweis des Zielgens mittels PCR könnte der direkte Nachweis der angereicherten Ziel-DNA in einem Agarosegel sein. Dazu müsste die Triplehelix mittels einer Restriktionsspaltung vom Streptavidinbead getrennt werden. Die für diese Nachweismethode notwendigen großen Mengen von aufgereinigter Ziel-DNA lassen sich am ehesten in Versuchen mit Plasmid-DNA erreichen. Damit hätte diese Methode für meine Arbeit keine wesentlichen neuen Erkenntnisse gebracht, denn die *in vitro*-Triplehelix-Bildung an kurzer linearer Ziel-DNA konnte bereits durch Gelretardationsversuche gezeigt werden.

Eine weitere interessante Alternative stellt die von Ito *et al.* (1992) verwendete Methode dar. Hier wurden die Hoogsteen-Bindungen der Triplehelices, nach der sequenzspezifischen Anreicherung des Zielgenfragmentes, durch Überführen in einen alkalischen Puffer aufgelöst. Die nach der anschließenden magnetischen Abtrennung der Streptavidinbeads mit den daran gekoppelten Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden zurückbleibende DNA (lineares bzw. zirkuläres Plasmid) wurde in *E. coli* transformiert und durch einen Stoffwechsel-Test nachgewiesen. Da diese Methode ein in *E. coli* expressionsfähiges Ziel- bzw. Reportergen erfordert, war der Einsatz in meinem Projekt nicht möglich.

Die in meinen Versuchen trotz methodischer Schwierigkeiten an isolierter genomischer DNA der Kartoffel-Linie TG11 nachgewiesene Triplehelix-Bildung bestätigte in diesem Punkt die Übertragbarkeit der im tierischen System erzielten Erkenntnisse auf das pflanzliche System. Sowohl die Effizienz der Oligonukleotid-Bindung als auch deren Sequenzspezifität waren vergleichbar. Die Eignung der ausgewählten Polypurinsequenz des gbssI-Gens der Kartoffel für eine Triplehelixbildung konnte damit gezeigt werden.

## 5.2 Transport von Oligonukleotiden in den Zellkern

Eine notwendige Voraussetzung für die Anwendung Triplehelix-bildender Oligonukleotide zur *in situ*-Modifizierung von Pflanzengenomen ist ihre Anreicherung im Zellkern. Deshalb wurde vor dem Beginn der Modifizierungsarbeiten an Modellgenomen untersucht, wie effizient Oligonukleotide von Protoplasten aufgenommen werden und in welchen Zeiträumen sie sich im Kern anreichern. Die Aufnahme der Oligonukleotide in die Zellen kann durch die Wahl der verwendeten Transformationsmethode und der Bedingungen (z.B. Oligonukleotid-Konzentration) beeinflusst werden. Dagegen ist der intrazelluläre Transport der Oligonukleotide vom Zytoplasma in den Zellkern experimentell wesentlich weniger beeinflussbar.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, Oligonukleotide in den Kern einer Zelle zu bringen. Ein direkter Weg ist die Mikroinjektion einer Oligonukleotid-Lösung direkt in den Zellkern. Die Verbringung der Oligonukleotide erfolgt dabei gezielt und kontrollierbar. Andererseits ist die Technik der Mikroinjektion sehr aufwändig und eignet sich nicht für die notwendige große Anzahl zu transfizierender Zellen.

Andere Verfahren basieren auf der Erfahrung, dass im Zytoplasma befindliche DNA (linear oder zirkulär) nach kurzer Zeit auch im Zellkern nachweisbar ist. Ob für diese Verlagerung der DNA gezielte Transportmechanismen oder Diffusionsprozesse verantwortlich sind, ist noch nicht abschließend geklärt (Gewirtz *et al.*, 1996). Beltinger *et al.* (1994) vermuteten Diffusionsprozesse als Ursache für die Anreicherung von Oligonukleotiden im Zellkern. Trotz einer gezielten Blockade aktiver Transportprozesse konnten fluoreszierende Oligonukleotide im Zellkern menschlicher Zellen nachgewiesen werden. Damit konnten nur passive Diffusionsprozesse die Ursache für die Anreicherung der Oligonukleotide im Zellkern sein.

Sind Oligonukleotide in den Kern der Zelle diffundiert, führen unspezifische Bindungen der Oligonukleotide an basische Kernproteine und an DNA im Allgemeinen sowie die spezifische Bindung der Oligonukleotide an die Zielsequenz zu einer Anreicherung im Zellkern.

In einer Arbeit zur Anwendung chimärer Oligonukleotide in Mais-Zellkulturen untersuchten Zhu *et al.* (1999) die zelluläre Lokalisierung der Oligonukleotide nach einem Partikelbeschuss. Dafür verwendeten sie eine Fluoreszenzmarkierung mit Hilfe von Rhodamin. In den beschossenen Mais-Suspensionskulturen und Epidermiszellen von Zwiebeln wurden die Oligonukleotide eine Stunde nach der Transformation hauptsächlich im Zellkern detektiert. Das Zytoplasma zeigte nur eine diffuse Hintergrundfluoreszenz. Diese Arbeit bestätigt ein vergleichbares Verhalten von Oligonukleotiden in pflanzlichen Zellen.

In den von mir durchgeführten Versuchen wurden ebenfalls mit fluoreszierenden Molekülen markierte Oligonukleotide verwendet. Mit Hilfe eines Konfokalen Laserscanning Mikroskops (CLSM) wurde die Aufnahme der rotfluoreszierenden Oligonukleotide in die Protoplasten untersucht. Die beobachteten Raten von mehr als 50 % liegen deutlich über den üblicherweise mit Plasmid-DNA erzielten Ergebnissen. Wahrscheinlich begünstigt die geringe Größe der Oligonukleotide die Aufnahme der DNA durch während der Elektroporation geöffnete Poren der Zellmembran. Diese Aufnahme war unabhängig von der Art der verwendeten Markierung (Rhodamin bzw. TAMRA) und von der Länge der eingesetzten Oligonukleotide. Auch die Verteilung der Oligonukleotide zwischen Zytoplasma und Zellkern wurde am CLSM untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die verwendeten Triplehelix-bildenden bzw. bifunktionellen Oligonukleotide schon nach kurzer Zeit im Zellkern

anreicherten. Allerdings waren die beobachteten Zeiträume abhängig von der Art der Fluoreszenz-Markierung.

Die gezeigte Anreicherung der verwendeten Oligonukleotide im Zellkern ist eine Voraussetzung für die nachfolgend durchgeführten Modifizierungsversuche.

## 5.3 Arbeiten mit transgenen Modellgen-Pflanzen

### 5.3.1 Bewertung des gfp-Modellgensystems

Während der Modifizierungsversuche wurden verschiedene Kombinationen aus bifunktionellen Oligonukleotiden bzw. der Mutationsdomäne und den drei transgenen TG-Linien eingesetzt. Zusätzlich wurden Begleitparameter wie Präinkubation der Protoplasten und *heat shock*-Behandlung nach der Elektroporation variiert.

In der Kombination aus Protoplasten der TG-Linie11, der Mutationsdomäne und einer *heat shock*-Behandlung nach der Elektroporation konnte ein Protoplast mit gfp-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die aufgrund dieses positiven Ergebnisses durchgeführten Wiederholungen erbrachten keine weiteren Aktivierungen des gfp-Modellgens. Es blieb mit der beschriebenen Kombination bei einem positiven Ereignis unter 1,5 Millionen eingesetzten Protoplasten. Werden alle Versuche mit der Mutationsdomäne unter den verschiedenen Bedingungen und mit allen drei TG-Linien berücksichtigt, ergibt sich eine Gesamtzahl von 9,5 Millionen eingesetzten Protoplasten.

Die auf die optimale Kombination der Rahmenbedingungen bezogene Modifizierungseffizienz der Mutationsdomäne von  $0,7 \times 10^{-6}$  ist niedriger als die von Kochevenko und Willmitzer (2003) mit einem reinen DNA-Oligonukleotid in Tabak-Protoplasten erzielte Modifizierungsrate von  $7,5 \times 10^{-6}$ . Dabei muss berücksichtigt werden, dass das von Kochevenko und Willmitzer verwendete DNA-Oligonukleotid länger war (68 Basen) und durch Hybridisierung komplementärer Sequenzbereiche eine stabilisierende Haarnadel-Struktur bilden konnte. Die von Zhu *et al.* (1999) mit bifunktionellen Oligonukleotiden in Mais-Zellkulturen erreichten Modifizierungsraten von 1 bis  $1,5 \times 10^{-4}$  liegen dagegen deutlich höher als in den von mir durchgeführten Versuchen. Grundsätzlich muss auch berücksichtigt werden, dass die von mir beobachtete eine Modellgen-Aktivierung unter 1,5 Millionen Protoplasten auch auf ein spontanes Mutationsereignis zurückzuführen sein könnte.

In den Ansätzen mit bifunktionellen Oligonukleotiden konnten keine fluoreszierenden Protoplasten nachgewiesen werden. Die von Culver *et al.* (1999) in Lymphozyten-Zellkulturen nachgewiesenen Synergieeffekte im Zusammenwirken zweier funktioneller Domänen, die zu Modifizierungseffizienzen zwischen 1,2 % und 1,6 % führten, konnten in den von mir durchgeführten Versuchen nicht beobachtet werden.

Als hinderlich bei der Detektion möglicher gfp-exprimierender Zellen stellte sich die hohe unspezifische Hintergrundfluoreszenz der Kartoffel-Protoplasten heraus. Möglicherweise konnten dadurch schwach exprimierende Zellen nicht erkannt werden. Die als Positiv-Kontrollen mitgeführten Transformationsansätze mit gfp-Plasmid-DNA konnten nur Hinweise über die durch die Elektroporation erreichte Transformationsrate liefern. Die gfp-Fluoreszenz in den Kontrollansätzen war aufgrund der hohen Kopienzahl pro transfizierter Zelle wesentlich höher, als in den entsprechenden Ansätzen mit Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden zu erwarten gewesen wäre. Die Kontrollgen-Linien mit dem aktiven Modellgen konnten auch nicht als ideale Positiv-Kontrollen herangezogen werden, da sie das GFP-Protein konstitutiv exprimierten und sich damit größere Proteinmengen über einen längeren Zeitraum in der Zelle anreichern konnten.

Auch Tran *et al.* (2003) diskutieren die Frage, wieviele gfp-Gene pro Zelle aktiviert werden müssen, um eine sichtbare gfp-Fluoreszenz zu erreichen. Die Autoren scheiterten mit dem Versuch, mit Hilfe chimärer Oligonukleotide ein in Fibroblasten chromosomal integriertes gfp-Reportergen zu aktivieren, obwohl die gleichen chimären Oligonukleotide das entsprechende gfp-Reportergen auf einem Plasmid lokalisiert mit bis zu 2,4 % Effizienz modifiziert hatten. Neben einer ca. 100-fach geringeren Modifizierungsrate eines chromosomalen Zielgens im Vergleich zu einem episomalen Zielgen betonten die Autoren auch den Umstand, dass es bisher keine Angaben darüber gibt, wieviele aktivierte gfp-Gene pro Zelle für eine sichtbare Fluoreszenz notwendig sind. In den erfolgreichen Versuchen mit dem episomal lokalisierten gfp-Reportergen waren bis zu 200 Plasmide pro Zellkern mikroinjiziert worden.

Konkrete Voraussagen über die zu erwartende Intensität der gfp-Fluoreszenz aufgrund der Aktivierung des Modellgens waren für meine Versuche somit nicht möglich. Das gfp-Modellgen-System konnte somit nicht die ursprünglich vorgesehene Aufgabe der Optimierung von bifunktionellen Oligonukleotiden in einem transienten Testsystem erfüllen. Trotzdem wurden anschließend die geplanten Modifizierungsversuche mit dem selektierbaren bar-Modellgen durchgeführt, weil mit diesem System möglicherweise auch solche Aktivierungsereignisse hätten detektiert werden können, die aufgrund einer schwachen gfp-Fluoreszenz möglicherweise nicht sichtbar waren.

In den bisher veröffentlichten Arbeiten zur Aktivierung eines Modellgens wurden häufig Resistenzgene verwendet. Mit der Selektion positiver Ereignisse wurde überwiegend erst mehrere Tage nach dem Einsatz modifizierender Oligonukleotide begonnen. Den Zellen wurde somit die Möglichkeit gegeben, nach den negativen Begleiterscheinungen der jeweils verwendeten Transformationsmethode und der erfolgreichen Modifizierung des Zielgens ausreichende Mengen des jeweiligen resistenzvermittelnden Proteins zu bilden.

So wurde in der Arbeit von Kochevenko und Willmitzer (2003) mit der Selektion modifizierter Tabak-Protoplasten auf eine aktivierte Herbizid-Resistenz erst zwei Wochen nach dem Einsatz chimärer Oligonukleotide begonnen.

Die von Beetham *et al.* (1999) durchgeführten Versuche mit chimären Oligonukleotiden hatten neben der Aktivierung eines selektierbaren Herbizid-Resistenzgens auch das Ziel der Aktivierung eines gfp-Modellgens. Das Modellgen war durch eine Basendeletion im Leseraster verschoben und dadurch inaktiv. Durch die Anwendung der chimären Oligonukleotide sollte eine Base inseriert und dadurch der Leserahmen wieder hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurden Blätter transgener Tabak-Pflanzen, die das mutierte Reportergen enthielten mit den entsprechend beschichteten Partikeln beschossen. Im Zeitraum von drei bis acht Tagen nach dem Beschuss wurden die Blätter auf ihre gfp-Fluoreszenz untersucht. Die Autoren berichten von erfolgreichen Aktivierungsereignissen des gfp-Reportergens. Konkrete Angaben über die Effizienz der Baseninsertion und die Intensität der gfp-Fluoreszenz im Vergleich zu Positiv-Kontrollen wurden leider nicht gemacht. Durch die Möglichkeit der modifizierten Zellen, über einen Zeitraum von bis zu acht Tagen das GFP-Protein zu produzieren, ist dieser Versuch nicht direkt vergleichbar mit meinen Versuchen. Zudem ist die unspezifische Hintergrundfluoreszenz in Tabak wesentlich geringer als in Kartoffel und damit der Nachweis auch schwacher gfp-Fluoreszenzen einfacher zu führen.

Eine Arbeit, die ebenfalls die Aktivierung eines gfp-Modellgens zum Ziel hatte, wurde 1999 von Zhu *et al.* veröffentlicht. Für die Versuche wurden Zellkulturen transgener Mais-Pflanzen verwendet. Hier war das Modellgen eine Fusion aus einem pat-Gen (Phosphinothricin-Acetyltransferase) und einem gfp-Gen. Das konstitutiv aktive pat-Gen diente der Selektion transgener Pflanzen. Die gfp-Sequenz wurde durch ein Stop-Codon zwischen beiden Leserahmen nicht translatiert. Nach dem Partikelbeschuss mit den entsprechenden chimären Oligonukleotiden wurden die Proben vier Tage weiterkultiviert und dann

fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Häufigkeit der Sequenzmodifikation lag bei 1 bis  $1,5 \times 10^{-4}$ . Aufgrund der Inkubation der Proben vor der Analyse für vier Tage sind die Bedingungen der gfp-Fluoreszenz-Analyse annähernd vergleichbar mit den für maximal drei Tage inkubierten Protoplasten in meinem Projekt. Allerdings wurden auch von Zhu *et al.* keine Angaben über die Vergleichbarkeit der Intensität der durch die Aktivierung des Modellgens bewirkten gfp-Fluoreszenz mit Positiv-Kontrollen gemacht.

### 5.3.1.1 Integrationsort des Modellgens

Möglicherweise kann der Integrationsort des Modellgens im pflanzlichen Genom meine Ergebnisse beeinflusst haben. Mehrere Arbeiten belegen eine verminderte Rate der Triplehelix-Bildung bzw. deren vollständige Blockierung, wenn sich die Zielsequenz in einer Nucleosomen-Struktur befindet. In einem Nucleosom ist die DNA-Sequenz mit einer Länge von ca. 146 bp 1,8 mal um den aus acht Histonen bestehenden Protein-Komplex gewunden.

In Versuchen mit *in vitro* rekonstituierten Nucleosomen und einer zentral eingebauten Zielsequenz konnten Brown *et al.* (1996) zeigen, dass die Triplehelix-Bildung sowohl mit Pyrimidin- als auch mit Purin-Oligonukleotiden blockiert war. Wurde die Zielregion dagegen am Rand des Nucleosoms platziert, konnte eine Triplehelix-Bildung nachgewiesen werden. Die Daten der ersten Veröffentlichung wurden von den gleichen Autoren durch umfangreiche Versuche bestätigt (Brown *et al.*, 1998).

Auch Westin *et al.* (1995) konnten zeigen, dass vorhandene Nucleosomen-Strukturen die Ausbildung von Triplehelices verhindern. Umgekehrt fanden sie aber auch, dass vorhandene Triplehelices die Ausbildung von Nucleosomen in diesen Bereichen unterbinden.

Zusammengefasst zeigen diese Beispiele, dass es starke Interaktionen zwischen Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden und Nucleosomen in Chromatin-Strukturen gibt. Wie sich diese *in vivo* auf ein konkretes Transgen auswirken, ist jedoch im konkreten Einzelfall nicht vorhersagbar. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb jeweils mehrere transgene Linien aus unabhängigen Transformationsereignissen verwendet, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens negativer Einflüsse zu minimieren. Zudem waren alle verwendeten transgenen Linien durch die RT-PCR-Analyse auf eine starke Expression des Modellgens untersucht worden. Dadurch sollten Linien mit Transgen-Insertionen in transkriptorisch besonders inaktiven Genombereichen ausgeschlossen werden.

### 5.3.1.2 Häufigkeit der homologen Rekombination

Da die vorhergehend diskutierten Punkte auch für das tierische System zutreffen, können sie nicht allein die Ursache für die geringe bzw. fehlende Aktivierung des gfp-Modellgens in meiner Arbeit sein. Ein weiterer zu diskutierender Punkt ist die unterschiedliche Häufigkeit homologer Rekombinationsereignisse in bestimmten tierischen Zelltypen und pflanzlichen Zellen (s. 1.2). Auch bei der Verwendung chimärer Oligonukleotide zur *in situ*-Modifizierung von Genen liegen die im pflanzlichen System erreichten Effizienzen ca. drei Größenordnungen niedriger als die im tierischen System festgestellten (Zhu *et al.*, 1999). Kochevenko und Willmitzer (2003) diskutieren als eine mögliche Ursache für diesen gravierenden Unterschied die mögliche Existenz verschiedener genetischer Reparaturabläufe in pflanzlichen und tierischen Zellen.

Da die von mir durchgeführten *in vitro*-Versuche positive Hinweise auf die Eignung der später in den Modifizierungsversuchen verwendeten bifunktionellen Oligonukleotide ergaben,



könnte die entscheidende Blockade des Gesamtprozesses im Ablauf dieser diskutierten genetischen Reparaturabläufe in pflanzlichen Zellen zu finden sein.

Diese Frage konnte im Rahmen meines anwendungsorientierten Projektes nicht geklärt werden. Das Verständnis dieser Rekombinationsprozesse könnte eine wichtige Grundlage für eine effiziente und praxisrelevante Anwendung Triplehelix-bildender und bifunktioneller Oligonukletide als neue Werkzeuge zur *in situ*-Modifizierung von Pflanzengen sein.

### 5.3.2 Mögliche Ursachen für die unerwartete PPT-Resistenz transgener TG-Linien mit dem bar-Modellgen

Nach dem PCR-Nachweis des bar-Modellgens in regenerierten Sprossen wurden Stecklinge dieser transgenen Linien auf Selektionsmedium mit Phosphinothricin (PPT) kultiviert. Durch das Absterben der TG-Linien und das unbeeinträchtigte Wachstum der entsprechenden KG-Linien schienen die Voraussetzungen für die *in situ*-Modifizierungsarbeiten gegeben zu sein. Mit den entsprechenden bifunktionellen Oligonukleotiden wurde eine größere Zahl von Modifizierungsversuchen durchgeführt. Ausgelöst durch die hohe Zahl der aus diesen Versuchen regenerierten PPT-resistenten Kalli wurden die verwendeten TG-Linien im ELISA-Test auf eine bar-Expression untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass trotz des Stop-Codons am Beginn der bar-Gensequenz eine Expression des resistenzvermittelnden Proteins nachgewiesen werden konnte (s. 4.5.6). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Eigenschaften der gfp-TG-Linien. In diesen Linien konnte phänotypisch keine gfp-Fluoreszenz festgestellt werden. Die gfp-TG-Linien zeigten auch in den Western-Analysen kein GFP-Protein. Für die Expression des bar-Modellgens in TG-Linien kommen ein Durchlesen des Stop-Codons oder eine interne Reinitiation während der Translation der Modellgen-mRNA in Frage.

Die Thematik des Durchlesens von Stop-Codons ist in der Vergangenheit intensiv untersucht worden. Da Pflanzenviren dieses Phänomen bei der Expression ihrer multicistronischen RNAs nutzen, wurden für Versuche häufig virale Sequenzen als Kontext für die zu untersuchenden Stop-Codons verwendet. Skuzeski *et al.* (1990) konnten anhand von *in vivo*-Versuchen in Tabak-Protoplasten zeigen, dass ein Amber-Stop-Codon (UAG) in Abhängigkeit von der direkten Sequenzumgebung in 0-5 % durchgelesen werden kann. Von Bossi (1983) wurde gezeigt, dass die erste Base 3' vom Stop-Codon (UAG) die Durchleserate entscheidend beeinflusst. Auch von Valle *et al.* (1992) wurden *in vitro*-Versuche zur Durchleserate des Amber-Codons innerhalb verschiedener Sequenzkontexte durchgeführt, die Ergebnisse bis ca. 30 % erbrachten. Zusätzlich wurde von Valle *et al.* eine Variante mit dem als besonders sicher geltenden UAA-Stop-Codon untersucht, das auch in meinen Versuchen in den TG-Konstrukten verwendet wurde. Im untersuchten viralen Sequenzkontext wurde eine Durchleserate von 10,6 % beobachtet. Da diese Sequenzumgebung nicht der in den TG-Konstrukten entsprach, kann dieses Ergebnis nicht auf die vorliegende Arbeit übertragen werden. Es muss aber als Hinweis für die Möglichkeit einer geringen Expression des bar-Gens trotz vorgeschaltetem Stop-Codon gewertet werden. Da die Durchleserate entscheidend von dem Sequenzumfeld des verwendeten Stop-Codons abhängt, können im Einzelfall keine konkreten Vorhersagen getroffen werden. Möglicherweise reichen schon geringe Mengen des resistenzvermittelnden Proteins aus, um ein Wachstum der entsprechenden Pflanzen auf Medium mit Phosphinothricin zu ermöglichen.

Als zweite Möglichkeit für die unerwartete Expression des bar-Gens in den TG-Konstrukten könnte eine Reinitiation oder interne Initiation der Translation am 3' vom Stop-Codon gelegenen zweiten Start-Codon in Frage kommen. Chabregas *et al.* (2002) konnten zeigen,

dass die Translation eines kerncodierten Gens von *Arabidopsis thaliana* sowohl am ersten Start-Codon als auch an einem stromabwärts gelegenen internen Start-Codon beginnen kann. Die dadurch entstandenen unterschiedlichen Proteine wurden in verschiedene Zellorganellen transloziert.

In der hier diskutierten Arbeit befand sich im Unterschied zu Chabregas *et al.* (2000) ein Stop-Codon direkt 5' vom internen Start-Codon. Über die Häufigkeit der Nutzung eines internen Start-Codons für einen Translationsstart unter diesen speziellen Bedingungen konnten in der Literatur keine Hinweise gefunden werden.

Ein weiteres zu diskutierendes Ergebnis sind die Unterschiede in der Reaktion der TG-Linien auf PPT bei der ersten Testung vor der Durchführung der Modifizierungsversuche und bei späteren Untersuchungen nach diesen Versuchen. Möglicherweise hat der Wirkstoff abhängig vom physiologischen Entwicklungszustand einer Pflanze unterschiedlich starke Auswirkungen auf deren Vitalität. Die von den Kalli abgetrennten Sprosse hatten bei der ersten Resistenztestung auf PPT-haltigem Medium möglicherweise noch keine voll aktivierte Photosynthese. Die blassgrüne Farbe der Blätter könnte ein Hinweis darauf gewesen sein. Zudem wurden sie bis zu diesem Zeitpunkt auf Selektionsmedium mit Kanamycin kultiviert und waren dadurch möglicherweise zusätzlich beeinträchtigt. Die von Sauer *et al.* (1987) beschriebene Inhibierung der Photosynthese durch PPT könnte somit Pflanzen in diesem Stadium schwerer schädigen als voll entwickelte photosynthetisch aktive Pflanzen. Dagegen spricht, dass die von Tachibana *et al.* (1986) als Folge einer PPT-Anwendung beschriebene schnelle Akkumulierung von Ammonium in aktiv stoffwechselnden Blättern eher die voll entwickelten Pflanzen hätte absterben lassen müssen.

Bisher wurden für die Aktivierung einer selektierbaren Resistenz Gene verwendet, die endogen vorhanden waren. So modifizierten Zhu *et al.* (2000) das im Maisgenom natürlich vorhandene Acetohydroxyacid-Synthase- (AHAS) Gen. Der gezielte Austausch einer Aminosäure führte zu einer selektierbaren Resistenz gegen das Herbizid Imidazolin. Beetham *et al.* (1999) und Kochevenko und Willmitzer (2003) modifizierten jeweils das im Tabakgenom enthaltene Gen für die Acetolactat-Synthase (ALS). Die eingeführten Punktmutationen führten zu Pflanzen mit einer Resistenz gegen Chlorosulfon. Alle genannten Arbeiten wurden mit chimären Oligonukleotiden durchgeführt.

Vergleichbare Arbeiten zur Aktivierung eines inaktivierten Markergens auf der Basis des bar- bzw. pat-Gens mittels Triplehelix-bildender, bifunktioneller oder auch chimärer Oligonukleotide sind bisher nicht bekannt.

## 6 Zusammenfassung

Ziel des vorgestellten Projektes war die Evaluierung von Triplehelix-bildenden und bifunktionellen Oligonukleotiden als neue Werkzeuge zur *in situ*-Modifizierung von Pflanzengenomenen. Die Übertragbarkeit der im tierischen System erzielten Fortschritte auf Pflanzen sollte mit Hilfe der Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* und Kartoffel untersucht werden.

Als zu modifizierendes Zielgen wurde das Gen für die *granule-bound starch synthase I* (gbssI) der Kartoffel verwendet. Eine gezielte Sequenzänderung in der Polypurinregion dieses Gens würde eine veränderte Stärkezusammensetzung zur Folge haben und damit zu einem wirtschaftlich interessanten Phänotyp führen.

Es wurden Triplehelix-bildende Oligonukleotide entworfen und auf ihre Bindungseigenschaften an die Zielsequenz untersucht. Mit Hilfe von *in vitro*-Hybridisierungen zwischen Zielsequenzen und Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden konnte eine effiziente und sequenzspezifische Bindung gezeigt werden. Auch mit isolierter genomischer DNA aus Modellgen-Pflanzen wurde eine sequenzspezifische Bildung von Triplehelices nachgewiesen. Damit wurde die Eignung der ausgewählten Polypurinsequenz des gbssI-Gens der Kartoffel für die Versuche zur *in situ*-Modifizierung von Pflanzengenomenen gezeigt.

Als zweiter Schritt wurde die Aufnahme von Oligonukleotiden in die Zellen und der anschließende Transport in den Zellkern untersucht. Die dafür verwendeten fluoreszenzmarkierten Triplehelix-bildenden und bifunktionellen Oligonukleotide wurden effizient von den Zellen aufgenommen und reichert sich nach kurzer Zeit im Zellkern an. Die Voraussetzungen für *in situ*-Modifizierungsversuche waren damit gegeben.

Für Untersuchungen in einem transienten System wurde die Gensequenz des *green fluorescent protein* (gfp) translational mit dem Polypurinbereich des gbssI-Gens fusioniert. Durch ein Stop-Codon zwischen den Leserahmen war die Testgen-Variante (TG) des Modellgens in transgenen Pflanzen inaktiv. Eine Kontrollgen-Variante (KG) ohne Stop-Codon entsprach der angestrebten Modifizierung und fungierte als Positiv-Kontrolle für die Funktion des Fusionsgens. Verschiedene Varianten bifunktioneller Oligonukleotide und die reine Mutationsdomäne wurden in Protoplasten transgener TG-Pflanzen transformiert. Ein erfolgreiches Aktivierungsereignis des Modellgens durch eine Modifizierung des Stop-Codons zu einem Sinn-Codon wurde unter Verwendung der Mutationsdomäne gefunden.

Für ein selektierbares Modellgen-System wurde die Sequenz des Bialaphos-Resistenzgens (bar) translational mit dem Polypurinbereich des gbssI-Gens fusioniert. Analog zum gfp-Modellgen wurden KG- und TG-Varianten erstellt. Transgene Pflanzen der Kontrollgen-Variante (KG) ohne Stop-Codon fungierten als Positiv-Kontrollen für die Funktion des Fusionsgens und zeigten auf Selektionsmedium eine deutliche Resistenz gegen Phosphinothricin. Direkt nach der Regeneration von TG-Linien untersuchte kleine Stecklinge waren sensitiv gegenüber dem Wirkstoff. Dagegen zeigten später untersuchte voll entwickelte Pflanzen aus *in vitro*-Kultur eine mit den Positiv-Kontrollen vergleichbare Resistenz gegen Phosphinothricin. Mit Hilfe eines ELISA-Tests konnte eine Expression des resistenzvermittelnden Proteins sowohl in KG- als auch in TG-Linien nachgewiesen werden. Damit erwies sich dieses Selektionssystem als ungeeignet für die vorgesehenen Versuche. Mögliche Ursachen für die Aktivität der TG-Variante des Modellgens werden diskutiert.


In den von mir durchgeführten *in vitro*-Versuchen konnte die sequenzspezifische Ausbildung von Triplehelices zwischen Triplehelix-bildenden Oligonukleotiden und kurzer linearer Ziel-DNA, die Ausbildung von Triplehelices an isolierter genomischer DNA und der Transport Triplehelix-bildender und bifunktioneller Oligonukleotide in den Zellkern nachgewiesen werden. Die Barriere der niedrigen homologen Rekombinationsrate pflanzlicher Zellen wurde durch die postulierten Synergieeffekte bifunktioneller Oligonukleotide nicht überwunden. Eine Praxisrelevanz Triplehelix-bildender und bifunktioneller Oligonukleotide zur *in situ*-Modifizierung des gbssI-Gens besteht zur Zeit nicht. Die spezifischen Unterschiede zwischen tierischen und pflanzlichen Zellen im Bereich der Rekombinationsprozesse verhindern bislang eine Anwendung Triplehelix-bildender und bifunktioneller Oligonukleotide zur *in situ*-Modifizierung von Pflanzengen in der Praxis der modernen Pflanzenzüchtung.

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenzen von gfp-Modellgenen mit 550 bp-Insert

#### 7.1.1 KG-gfp-ER in pLH9000

```

801  CGTTCCAACC ACGTCTTCAA AGCAAGTGGA TTGATGTGAT ATCTCCACTG
851  ACGTAAGGGA TGACGCACAA TCCCACATATC CTTGCAAGA CCCTTCCTCT
901  ATATAAGGAA GTTCATTTC A TTTGGAGAGA ACACGGGGGA CTCTAGAGGA
951  TCCAAGGAGA TATAACAATG AAGACTAATC TTTTCTCTT TCTCATCTTT
1001 TCATTCTCC TATCATTATC CTCGGCCGAA TTCGGCCGCG GACATCGGGT
      EcoRI
1051 AATGACAATA TCCCCCGTT ATGACCAATA CAAAGATGCT TGGGATACTG
1101 GCGTTGCGGT TGAGGTCAA GTTGGAGACA GCATTGAAAT TGTCGTYTC
1151 TTTCACTGCT ATAAACGTGG GGTGATCGT GTTTTGTG ACCACCCAAT
1201 GTTCTTGAG AAAGTTTGGG GCAAACTGG TTCAAAAATC TATGGCCCCA
1251 AAGCTGGACT AGATTATCTG GACAATGAAC TTAGGTTTCT CTTGTTGTGT
1301 CAAGCAGCCC TAGAGGCACC TAAAGTTTTG AATTGAACA GTAGCAACTA
1351 CTTCTCAGGA CCATATGGAG AGGATGTTCT CTTCAATGCC AATGATTGGC
1401 ACACAGCTCT CATTCCTTGC TACTTGAAGT CAATGTACCA GTCCAGAGGA
1451 ATCTATTTGA ATGCAAGGT TGCTTTCTGC ATCCATAACA TTGCCTACCA
1501 AGGCCGATTT TCTTTCTCTC TCTTCCCTCT TCTCAATCTT CCTGAAGAAT
      EcoRI
1551 TCAGTAAAGG AGAAGAACTT TTTCACTGGAG TTGTCCCAAT TCTTGTTGAA
1601 TTAGATGGTG ATGTTAATGG GCACAAATTT TCTGTCAGTG GAGAGGGTGA
1651 AGGTGATGCA ACATACGGAA AACTTACCCT TAAATTTATT TGCACACTG
      

```

Dargestellt ist ein Teil einer mit Hilfe des 35S-Prom.-Primers erhaltenen Sequenz des 550 bp-gfp-Modellgens. Fett dargestellt sind das Start-Codon und die für die Klonierung der Polypurinsequenz genutzten *EcoRI*-sites. Der Fusionsleserahmen ist im gesamten sequenzierten Modellgen nicht unterbrochen.

### 7.1.2 TG-gfp-ER in pLH9000

```
881  CTATCCTTCG CAAGACCCTT CCTCTATATA AGGAAGTTCA TTTCATTTGG
931  AGAGAACACG GGGGACTCTA GAGGATCCAA GGAGATATAA CAATGAAAGAC
981  TAATCTTTTT CTCTTTCTCA TCTTTTCACT TCTCCTATCA TTATCCTCGG
1031 CCGAATTCGC CCGCGGACAT CGGGTAATGA CAATATCCCC CCGTTATGAC
      EcoRI
1081 CAATACAAAG ATGCTTGGGA TACTGGCGTT GCGGTTGAGG TCAAAGTTGG
1131 AGACAGCATT GAAATTGTTC GTYTCTTTCA CTGCTATAAA CGTGGGGTTG
1181 ATCGTGTTTT TGTTGACCAC CCAATGTTCT TGGAGAAAGT TTGGGGCAAA
1231 ACTGGTTCAA AAATCTATGG CCCCAAAGCT GGACTAGATT ATCTGGACAA
1281 TGAACTTAGG TTCAGCTTGT TGTGTCAAGC AGCCCTAGAG GCACCTAAAG
1331 TTTTGAATTT GAACAGTAGC AACTACTTCT CAGGACCATA TGGAGAGGAT
1381 GTTCTCTTCA TTGCCAATGA TTGGCACACA GCTCTCATTC CTTGCTACTT
1431 GAAGTCAATG TACCAGTCCA GAGGAATCTA TTTGAATGCC AAGGTTGCTT
1481 TCTGCATCCA TAACATTGCC TACCAAGGCC GATTTTCTTT CTCTCTCTTC
1531 CCTCTTCTCA ATCTTCCTTA AGAATTCAGT AAAGGAGAAG AACTTTTCAC
      EcoRI
1581 TGGAGTTGTC CCAATTCTTG TTGAATTAGA TGGTGATGTT AATGGGCACA
```

Dargestellt ist ein Teil einer mit Hilfe des 35S-Prom.-Primers erhaltenen Sequenz des 550 bp-gfp-Modellgens. Fett dargestellt sind das Start-Codon, das Stop-Codon und die für die Klonierung der Polypurinsequenz genutzten *EcoRI*-sites. Der Fusionsleserahmen endet am Stop-Codon vor dem Beginn der gfp-Gen-Sequenz.

### 7.1.3 KG- pCK gfp S65C in pLH9000

```

401  TGGAGAGGAC  CTCGAGAATT  CTCAACACAA  CATATACAAA  ACAAACGAAT
451  CTCAAGCAAT  CAAGCATTCT  ACTTCTATTG  CAGCAATTTA  AATCATTTCT
501  TTAAAGCAA  AAGCAATTTT  CTGAAAATTT  TCACCATTTA  CGAACGATAG
551  CCATGGCCCG  CGGACATCGG  GTAATGACAA  TATCCCCCG  TTATGACCAA
      NcoI
601  TACAAAGATG  CTTGGGATAC  TGGCGTTGCG  GTTGAGGTCA  AAGTTGGAGA
651  CAGCATTGAA  ATTGTTCTGT  TCTTTCCTG  CTATAAACGT  GGGGTTGATC
701  GTGTTTTTGT  TGACCACCCA  ATGTTCTTGG  AGAAAGTTTG  GGGCAAAACT
751  GGTTCAAAAA  TCTATGGCCC  CAAAGCTGGA  CTAGATTATC  TGGACAATGA
801  ACTTAGGTTC  AGCTTGTTGT  GTCAAGCAGC  CCTAGAGGCA  CCTAAAGTTT
851  TGAATTTGAA  CAGTAGCAAC  TACTTCTCAG  GACCATATGG  AGAGGATGTT
901  CTCTTCATTG  CCAATGATTG  GCACACAGCT  CTCATTCCTT  GCTACTTGAA
951  GTCAATGTAC  CAGTCCAGAG  GAATCTATTT  GAATGCCAAG  GTTGCTTTCT
1001 GCATCCATAA  CATTGCCTAC  CAAGGCCGAT  TTTCTTTCTC  TCTCTTCCCT
1051 CTTCTCAATC  TTCCTGAAGA  ATTCACCATG GGTAAAGGAG AAGAACTTTT
      NcoI
1101 CACTGGAGTT  GTCCAATTC  TTGTTGAATT  AGATGGTGAT

```

Dargestellt ist ein Teil einer mit Hilfe des 35S-Prom.-Primers erhaltenen Sequenz des 550 bp-gfp-Modellgens. Fett dargestellt sind das Start-Codon und die für die Klonierung der Polypurinsequenz genutzten *NcoI*-sites. Der Fusionsleserahmen ist im gesamten sequenzierten Modellgen nicht unterbrochen.

## 7.2 Sequenzen von gfp-Modellgenen mit 39 bp-Insert

### 7.2.1 KG gfp-ER in pLH9000

```

1      AAAAAAtARA AAaAAAgASa WWRctAtAtA tAagggAgTT CatTTcATTT
51     GGAGAGAAca cGGGGGAcTc TAGAGGATcc AAGGAGATAT AAcAATGAAG
101    AcTAATcTTT TTsTcTTTcT cATcTTTTcA cTTcTcCTAT cATTATccTc
151    GGccGAATTc TTTTcTTTcT CTCTCTTCCC TCTTCTCGAA TTcAgTAAAG
        EcoRI                                EcoRI
201    GAGAAGAACT TTTCAC TGGA GTTGTC CCAA TTCTTGTTGA ATTAGATGGT
251    GATGTTAATG GGCACAAAtt tTCTGTCAGT GGAGAGGGTG gAGGTGATGC
301    aACATACGGA AAAcTTACCC TTAAATTTAT TTGCACTACT GGAAAActAC
351    CTGTTCCATG GCCAACACTT GTCAC TACTT TCTCTTATGG TGTTC AATGC

```

Dargestellt ist ein Teil einer mit Hilfe des 35S-Prom.-Primers erhaltenen Sequenz des 39 bp-gfp-Modellgens. Fett dargestellt sind das Start-Codon und die für die Klonierung genutzten *EcoRI*-sites. Der Fusionsleserahmen ist im gesamten sequenzierten Modellgen nicht unterbrochen.

### 7.2.2 TG gfp-ER 39 bp in pLH9000

```

1      SKMKccKKcG SVaGaCctKC CTCTATATAA GGAAGTTCAT TTCATTTGGA
51     GAGAACACGG GGGACTCTAG AGGATCCAAG GAGATATAAC AATGAAGACT
101    AATCTTTTTTc TCTTTCTCAT CTTTTCAC TTTCTCCTATCAT TATCCTCGGC
151    CGAATTcTTT TCTTTCTCTC TCTTCCCTCT TCTCTAAGAA TTCAGTAAAG
        EcoRI                                EcoRI
201    GAGAAGAACT TTTCAC TGGA GTTGTC CCAA TTCTTGTTGA ATTAGATGGT
251    GATGTTAATG GGCACAAATT TTCTGTCAGT GGAGAGGGTG aAGGTGATGC
301    AACATACGGA AAActTACCC TTAAATTTAT TTGCACTACT GGAAAACTAC
351    CTGTTCCATG GCCAACACTT GTCAC TACTT TCTCTTATGG TGTTC AATGC

```

Dargestellt ist ein Teil einer mit Hilfe des 35S-Prom.-Primers erhaltenen Sequenz des 39 bp-gfp-Modellgens. Fett dargestellt sind das Start-Codon, das Stop-Codon und die für die Klonierung genutzten *EcoRI*-sites. Der Fusionsleserahmen endet am Stop-Codon.



### 7.2.3 KG pGJ304 39bp in pLH9000

```

1      VKCBtCScWT  TTtTTtYTSt  gKRtWAgGAR  TTctTTCATt  tGGRgAGGAc
51     CTCGAgaATT  CTCAACACAA  CATATACAAA  ACAAACGAAT  CTCAAGCAAT
101    CAAGCATTCT  ACTTCTATTG  CAGCAATTTA  AATCATTTCT  TTAAAGCAA
151    AAGCAATTTT  CTGAAAATTT  TCACCATTTA  CGAACGATAG  CCATGGGATT
                                           NcoI
201    TTCTTTCTCT CTCTTCCcTc TTCTCCCAT GGGTAAAGGA GAAGAACTTT
                                           NcoI
251    TCACTGGAGT TGTCCCAATT CTTGTTGAAT TAGATGGTGA TGTTAATGGG
301    CACAAATTTT CTGTCAGTGG AGAGGGTGGA GGTGATGCAA CATACGGAAA
351    ACTTACCCTT AAATTTATTT GCACTACTGG AAAACCTACCT GTCCTTGGC

```

Dargestellt ist ein Teil einer mit Hilfe des 35S-Prom.-Primers erhaltenen Sequenz des 39 bp-gfp-Modellgens. Fett dargestellt sind das Start-Codon und die für die Klonierung genutzten *NcoI*-sites. Der Fusionsleserahmen ist im gesamten sequenzierten Modellgen nicht unterbrochen.

### 7.2.4 TG pGJ304 39 bp in pLH9000

```

1      cCCMCYatCC  YtCGCMAGAC  CTTCTCTAT  ATAANgGMAG  TTCATTTTCAT
51     TTGGAGAGGA  CCTCGAGAAT  TCTCAACACA  ACATATACAA  AACAAACGAA
101    TCTCAAGCaA  TCAAGCATTC  TACTTCTATT  GCAGCAATTT  AAATCATTTTC
151    TTTTAAAGCA  AAAGCaATTT  TCTGAAAATT  TTCACCATT  ACGAACGATA
201    GCCATGGGGAT TTTCTTTCTC TCTCTTCCCT CTTCTCTAA CCATGGGTAA
           NcoI                                     NcoI
251    AGGAGAAGAA  CTTTTCACTG  GAGTTGTCCC  AATTCTTGTT  GAATTAGATG
301    GTGATGTTAA  TGGGCACAAA  TTTTCTGTCA  GTGGAGAGGG  TGRAGGTGAT
351    GCAACATACG  GAAAACCTAC  CCTTAAATTT  ATTTGCACTA  CTGGAAAAC

```

Dargestellt ist ein Teil einer mit Hilfe des 35S-Prom.-Primers erhaltenen Sequenz des 39 bp-gfp-Modellgens. Fett dargestellt sind das Start-Codon, das Stop-Codon und die für die Klonierung genutzten *NcoI*-sites. Der Fusionsleserahmen endet am Stop-Codon.



### 7.3.3 Kartoffel-Linie TG26

```

1      CNNTGAGCAT CGTGGAAAAA GAAGACGTTT CAACCACGTC TTCAAAGCAA
51     GTGGATTGAT GTGATATCTC CACTGACGTA AGGGATGACG CACAATCCCA
101    CTATCCTTCG CAAGACCCTT CCTCTATATA AGGAAGTTCA TTTCATTG
151    AGAGGACCTC GAGTGGCCAC CATGGGATTT TCTTTCTCTC TCTTCCCTCT
      NcoI
201    TCTCTAAACC ATGGGCCCAG AACGACGCCC GGCCGACATC CGCCGTGCCA
      NcoI
251    CCGAGGCGGA CATGCCGGCG GTCTGCACCA TCGTCAACCA CTACATCGAG
301    ACAAGCACGG TCAACT

```

Dargestellt ist der mit Hilfe des patseq-Primers sequenzierte Bereich des bar-Modellgens aus isolierter genomischer DNA der Linie TG26. Fett dargestellt sind das Start-Codon, das Stop-Codon und die für die Klonierung der Polypurinsequenz genutzten *NcoI*-sites. Der Fusionsleserahmen endet am Stop-Codon vor dem Beginn der bar-Gen-Sequenz.

### 7.3.4 Kartoffel-Linie TG41

```

1      TGAGCATCGT GGAAAAAGAA GACGTTCCAA CCACGTCTTC AAAGCAAGTG
51     GATTGATGTG ATATCTCCAC TGACGTAAGG GATGACGCAC AATCCCACTA
101    TCCTTCGCAA GACCCTTCCT CTATATAAGG AAGTTCATT CATTGGAGA
151    GGACCTCGAG TGGCCACCCAT GGGATTTTCT TTCTCTCTCT TCCCTCTTCT
      NcoI
201    CTAAACCATG GGCCCAGAAC GACGCCCGGC CGACATCCGC CGTGCCACCG
      NcoI
251    AGGCGGACAT GCCGGCGGTC TGCACCATCG TCAACCACTA CATCGAGACA
301    AGCA

```

Dargestellt ist der mit Hilfe des patseq-Primers sequenzierte Bereich des bar-Modellgens aus isolierter DNA der Linie TG41. Fett dargestellt sind das Start-Codon, das Stop-Codon und die für die Klonierung der Polypurinsequenz genutzten *NcoI*-sites. Der Fusionsleserahmen endet am Stop-Codon vor dem Beginn der bar-Gen-Sequenz.

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

35S	konstitutiver Promotor des <i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxosulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	Benzylaminopurin
bar	Bialaphos-Resistenz-Gen aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaMV	<i>cauliflower mosaic virus</i>
CLSM	Konfokales Laserscanningmikroskop
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
g	Gramm
G	Guanin
gbssI	<i>granule-bound starch synthase I</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde(n)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
mA	Milliampere
max.	maximal
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
μF	Mikrofarrad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
min	Minute(n)
NAA	1-Naphtylelessigsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPTII	Neomycinphosphotransferase II
OD	Optische Dichte

---

ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
pat	Phosphinothricin-Acetyltransferase-Gen
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht (ca. 16h)
u.s.w.	und so weiter
UVA	ultraviolett im langwelligen Bereich
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 7.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur der Triplehelix	6
Abbildung 2:	Triplehelix-bildende Oligonukleotide vom Purin-Typ binden in anti-paralleler Orientierung zum Polypurinstrang	8
Abbildung 3:	Triplehelix-bildende Oligonukleotide vom Pyrimidin-Typ binden in paralleler Orientierung zum Polypurinstrang	9
Abbildung 4:	Psoralen-Molekül über eine C6-Kohlenstoff-Brücke gekoppelt an ein Triplehelix-bildendes Oligonukleotid	10
Abbildung 5:	Bifunktionelle Oligonukleotide	13
Abbildung 6:	Magnetische Separation als Nachweismethode für die Ausbildung von Triplehelices	40
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Exon-/Intron-Struktur des gbssI-Gens mit einem Polypurinbereich in Exon 8	44
Abbildung 8:	Das Triplehelix-bildende Oligonukleotid Retard zusammen mit Zielsequenz (optimierte Polypurinsequenz aus gbssI) und Kontrollsequenz (durchmischte Polypurinsequenz).	46
Abbildung 9:	Gelretardationsanalyse des Triplehelix-bildenden Oligonukleotids Retard und verschiedener doppelsträngiger DNA-Sequenzen in Abhängigkeit vom pH-Wert	48
Abbildung 10:	Gelretardationsanalyse des Triplehelix-bildenden Oligonukleotids Retard und verschiedener doppelsträngiger DNA-Sequenzen nach Hybridisierungen bei verschiedenen Temperaturen	49
Abbildung 11:	Gelretardationsanalyse des Triplehelix-bildenden Oligonukleotids Retard und verschiedener doppelsträngiger DNA-Sequenzen nach Hybridisierungen für verschieden lange Zeiten	50
Abbildung 12:	Modell der Testgenvariante des Fusionsgens aus dem 550 bp-Bereich des gbssI-Gens mit Polypurin und dem mgfp5-ER-Gen	51
Abbildung 13:	Modell der Testgenvariante des Fusionsgens mit Stopcodon zwischen dem 550 bp-Bereich aus dem gbssI-Gen mit Polypurin und dem gfp-Gen aus pCK S65C gfp	52
Abbildung 14:	Modell Modell der Testgenvariante des Fusionsgens bestehend aus dem 39 bp-Insert zwischen dem ER-Targeting-Signal und der gfp-cDNA	54
Abbildung 15:	Modell der Testgenvariante des Fusionsgens bestehend aus dem 39 bp-Insert und dem gfp-Gen aus pGJ304	55
Abbildung 16:	RT-PCR von <i>Arabidopsis</i> -KG- und -TG-Linien	56
Abbildung 17:	Immunoblot einer Western-Analyse der aus transgenen <i>Arabidopsis</i> -Linien isolierten Proteine	57
Abbildung 18:	RT-PCR von Kartoffel-KG- und -TG-Linien	58
Abbildung 19:	Immunoblot einer Western-Analyse der aus transgenen Kartoffel-Linien isolierten Proteine	59
Abbildung 20:	Zielsequenz und Triplehelix-bildende Oligonukleotide zur magnetischen Separation mit Psoralen- und Biotin-Markierungen	60
Abbildung 21:	Nachweis der Triplehelix-Bildung des Oligonukleotids PsoBio6 an der Polypurinregion des Modellgens	61
Abbildung 22:	Sequenzausschnitt des gfp-Modellgens und Darstellung der bifunktionellen Oligonukleotide bi4gfp, bi5gfp und bi6gfp sowie der reinen Mutationsdomäne MDgfp für die <i>in situ</i> -Modifizierung des gfp-Modellgens	62
Abbildung 23:	Darstellung der verwendeten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide	64
Abbildung 24:	Anreicherung von Rhodamin-markierten Oligonukleotiden (Oligo3) im Zellkern von Kartoffel-Protoplasten	65
Abbildung 25:	Anreicherung von TAMRA-markierten Oligonukleotiden im Zellkern von Kartoffel-Protoplasten	66
Abbildung 26:	Modell der Testgenvariante des Fusionsgens bestehend aus dem 39 bp-Insert und dem bar-Gen aus pLH7000	70
Abbildung 27:	RT-PCR von Kartoffel KG- und -TG-Linien	71
Abbildung 28:	Sequenzausschnitt des bar-Modellgens und Darstellung der bifunktionellen Oligonukleotide bi4bar, bi5bar und bi6bar sowie der reinen Mutationsdomäne MDbar für die <i>in situ</i> -Modifizierung des bar-Modellgens	72

## 7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Oligonukleotide zur Untersuchung der Triplehelix-Bildung <i>in vitro</i> und <i>in situ</i>	19
Tabelle 2:	Oligonukleotide zur Modifizierung des gfp-Modellgens	20
Tabelle 3:	Oligonukleotide zur Modifizierung des bar-Modellgens	20
Tabelle 4:	Primer für PCR-Nachweise	20
Tabelle 5:	Übersicht über die mit dem bifunktionellen Oligonukleotid bi4gfp durchgeführten Modifizierungsversuche	67
Tabelle 6:	Übersicht über die mit dem bifunktionellen Oligonukleotid bi5gfp durchgeführten Modifizierungsversuche	68
Tabelle 7:	Übersicht über die mit dem bifunktionellen Oligonukleotid bi6gfp durchgeführten Modifizierungsversuche	68
Tabelle 8:	Übersicht über die mit dem Oligonukleotid MDgfp durchgeführten Modifizierungsversuche	68
Tabelle 9:	Übersicht über die mit Protoplasten aus transgenen bar-Modellgen-Pflanzen durchgeführten Modifizierungsversuche und die Zahl der daraus regenerierten Kalli	73
Tabelle 10:	BAR-ELISA-Werte transgener Kartoffel-Linien	73

## 7.7 Literatur

- Alberti, P., Arimiondo, P.B., Mergny, J.L., Garestier, T., Helene, C. and Sun, J.S., 2002, A directional nucleation-zipping mechanism for triple helix formation, *Nucleic Acids Res.* 30 (24) 5407-5415
- Bates, P.J., Macaulay, V.M., McLean, M.J., Jenkins, T.C., Reszka, A.P., Laughton, C.A. and Neidle, S., 1995, Characteristics of triplex-directed photoadduct formation by psoralen-linked oligodeoxynucleotides, *Nucleic Acids Res.* 23 (21) 4283-4289
- Bechtold, N. and Pelletier, G., 1998, In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration, *Methods Mol Biol.* 82 259-266
- Belousov, E.S., Afonina, I.A., Kutuyavin, I.V., Gall, A.A., Reed, M.W., Gamper, H.B., Wydro, R.M. and Meyer, R.B., 1998, Triplex targeting of native gene in permeabilized intact cells: covalent modification of the gene for the chemokine receptor CCR5, *Nucleic Acids Res.* 26 (5) 1324-1328
- Beltinger, C., Saragovi, H.U., Smith, R.M., LeSauter, L., Shah, N., DeDionsio, L., Christensen, L., Raible, A., Jarret, L. and Gerwitz, A.M., 1995, Binding, Uptake and Intracellular Trafficking of Phosphorothioate-modified Oligodeoxynucleotides, *J. Clin. Invest.* 95 1814-1823
- Beetham, P.R., Kipp, P.B., Sawycky, X.L., Arntzen, C.J. and May, G.D., 1999, A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations, *PNAS* 96 8774-8778
- Bossi, L., 1983, Context Effects: Translation of UAG Codon by Suppressor tRNA is Affected by the Sequence Following UAG in the Message, *J. Mol. Biol.* 164 73-87
- Brown, P.M. and Fox, K.R., 1996, Nucleosome core particles inhibit DNA triple helix formation, *Biochem. J.* 319 607-611
- Brown, P.M., Madden, C.A. and Fox, K.R., 1998, Triple-Helix Formation at Different Positions on Nucleosomal DNA, *Biochemistry* 37 16139-16151
- Bullock, W.O., Fernandes, J.M. and Short, J.M., 1987, A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection, *BioTechniques* 5 376-378
- Chabregas, S.M., Luche, D.D., Van Sluys, M.-A., Menck, C.F.M. and Silva-Filho, M.C., 2002, Differential usage of two in-frame translational start codons regulates subcellular localization of *Arabidopsis thaliana* TH11, *Journal of Cell Science* 116(2) 285-291
- Chan, P.P., Lin, M., Faruqi, A.F., Powell, J., Seidman, M.M. und Glazer, P.M., 1999, Targeted Correction of an Episomal Gene in Mammalian Cells by a Short DNA Fragment Tethered to a Triplex-forming Oligonucleotide, *The Journal of Biol. Chem.* 274(17) 11541-11548
- Clough, S.J. and Bent, A.F., 1998, Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 26(6) 735-743
- Cole-Strauss, A., Gamper, H., Holloman, W.K., Munoz, M., Cheng, N. and Kmiec, E.B., 1999, Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract, *Nucl. Acids Res.* 27(5) 1323-1330
- De Bizemont, T., Duval Valentin, G., Sun, J.S., Bisagni, E., Garestier, T. and Helene, C., 1996, Alternate strand recognition of double-helical DNA by (T,G)-containing oligonucleotides in the presence of a triple helix-specific ligand, *Nucleic Acid Res.* 24 1136-1143
- Dieterich, G., 2000, Molekularbiologische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung des putativen Transportproteins – P19,5k – des *beet western yellows virus* (BWYV) und Erarbeitung der Grundlagen für eine gentechnisch zu erzeugende Resistenz gegen das BWYV, Dissertation an der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig



- Felsenfeld, G., Davies, D.R. and Rich, A.**, 1957, *J. Am. Chem. Soc.* 79 2023-2024
- Fossela, J.A., Kim, Y.J., Shih, H., Richards, E.G. and Fresco, J.R.**, 1993, Relative specificities in binding of Watson – Crick base pairs by third strand residues in a DNA pyrimidine triplex motif, *Nucl. Acids Res.* 21(19) 4511-4515
- Gamper, H.B.Jr., Hou, Y.-M., Stamm, M.R., Podymnigin, M.A. and Meyer, R.B.**, 1998, Strand Invasion of Supercoiled DNA by Oligonucleotides with a Triplex Guide Sequence, *J. Am. Chem. Soc.* 120 2182-2183
- Gamper, H.B.Jr., Cole-Strauss, A. Metz, R., Parekh, H., Kumar, R. and Kmiec, E.B.**, 2000a, A plausible mechanism for gene correction by chimeric Oligonucleotides, *Biochemistry*, 39 5808-5816
- Gamper, H.B.Jr., Parekh, H., Rice, M.C., Bruner, M., Youkey, H. and Kmiec, E.B.**, 2000b, The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts, *Nucl. Acids Res.* 28(21) 4332-4339
- Gewirtz, A.M., Stein, C.A. and Glazer, P.M.**, 1996, Facilitating oligonucleotide delivery: Helping antisense deliver on its promise, *PNAS* 93 3161-3163
- Giovannangeli, C., Diviacco, S., Labrousse, V., Gryzanov, S., Charneau, P. and Helene, C.**, 1997, Accessibility of nuclear DNA to triplex-forming oligonucleotides: The integrated HIV-1 provirus as a target, *PNAS* 94 79-84
- Gitlin, L., Karelsky, S. and Andino, R.**, 2002, Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells, *Nature* 418(6897) 430-434
- Grigoriev, M., Praseuth, D., Robin, P., Hemar, A., Saison-Behmoares, T., Dautry-Varsat, A., Thuong, N.T., Helene, C. and Harel-Bellan, A.**, 1992, A Triple Helix-forming Oligonucleotide-Intercalator Conjugate Acts as a Transcriptional Repressor via Inhibition of NF  $\kappa$ B Binding to Interleukin-2 Receptor  $\alpha$ -Regulatory Sequence, *The Journal of Biol. Chem.* 267(5) 3389-3395
- Hartwig, A.**, 2001, Role of Magnesium in genomic stability, *Mutation Research* 475 113-121
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C. and Hodge, S.**, 1997, Removal of a cryptic intron and subcellular localisation of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly, *PNAS* 94 (6) 2122-2127
- Hausmann, L. and Töpfer, R.**, 1999, Entwicklung von Plasmid-Vektoren, *Vort. Pflanzenzüchtung* 45 155-172
- Herrmann, S., Schilde-Rentschler, L. and Ninnemann, H.**, 1990, Protoplast regeneration and ethylene production in a diploid line of *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, VII<sup>th</sup> International Congress on Plant, Tissue and Cell Culture, Amsterdam
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hoykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A.**, 1983, A binary plant transformation vector strategy based upon separation of vir- and T-region of *A.tumefaciens*, *Nature* 303 179-180
- Hoogsteen, K.**, 1959, The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine, *Acta Crystallogr.* 12 822-823
- Hunt, G.J. and Helgeson, J.P.**, 1988, A medium and simplified procedure for growing single cells from *Solanum* species, *Plant Science* 60(2) 251-257
- Htun, H. and Dahlberg, J.E.**, 1989, Topology and formation of triple-stranded H-DNA, *Science* 243 1571-1576
- Ito, T., Smith, C.L. and Cantor, C.R.**, 1992, Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture, *PNAS* 89 495-498
- Jasin, M., Moynahan, M.E. and Richardson, C.**, 1996, Targeted transgenesis, *PNAS* 93 8804-8808
- Kochevenko, A. and Willmitzer, L.**, 2003, Chimeric RNA/DNA Oligonucleotide-Based Site-Specific Modification of the Tobacco Acetolactate Synthase Gene, *Plant Physiology* 132 174-184

- Koncz, C. and Schell, J.**, 1986, The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector, *Mol Gen Genet* 204 383–396
- Kukreti, S., Sun, J.S., Garestier, T. and Helene, C.**, 1997, Extension of the range of DNA sequences available for triple helix formation: stabilization of mismatched triplexes by acridine-containing oligonucleotides, *Nucl. Acids Res.* 25 4264-4270
- Kukreti, S., Sun, J.S., Loakes, D.M., Nguyen, C.H., Bisagni, E., Garestier, T. and Helene, C.**, 1998, Triple helices formed at oligopyrimidine\*oligopurine sequences with base pair inversions: effect of a triplex-specific ligand on stability and selectivity, *Nucl. Acids Res.* 26 2179-2183
- Lebel, E.G., Masson, J., Bogucki, A. and Paszkowski, J.**, 1993, Stress-induced intrachromosomal recombination in plant somatic cells, *PNAS* 90 422-426
- Lee, J.S., Johnson, D.A. and Morgan, A.R.**, 1979, Complexes formed by (pyrimidine)<sub>n</sub> · (purine)<sub>n</sub> DNAs on lowering the pH are three-stranded, *Nucl. Acid Res.* 6(9) 3073-3091
- Luo, D. and Saltzman, W.M.**, 2000, Synthetic DNA delivery systems, *Nature Biotech.* 18 33-36
- Luo, Z., Macris, M.A., Faruqi, A.F. and Glazer, P.M.**, 2000, High-frequency intrachromosomal gene conversion induced by triplex-forming oligonucleotides microinjected into mouse cells, *PNAS*, 97(16) 9003-9008
- Majumdar, A., Khorlin, A., Dyatkina, N., Lin, F.L., Powell, J., Liu, J., Khripine, Y., Watanabe, K.A., George, J., Glazer, P.M. and Seidmann, M.M.**, 1998, Targeted gene knockout mediated by triple helix forming oligonucleotides, *Nat. Genet.* 20 (2) 212-214
- Majumdar, A., Puri, N., McCollum, N., Richards, S., Cuenoud, B., Miller, P. and Seidman, M.M.**, 2003, Gene Targeting by Triple Helix-Forming Oligonucleotides, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1002 141-153
- Moser, H.E. and Derva, P.B.**, 1987, Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation, *Science* 238 645-650
- Murashige, T. and Skoog, F.**, 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant* 15 473-497
- Olivas, W. and Maher, L.Jr.**, 1994, DNA recognition by alternate strand triple helix formation: affinities of oligonucleotides for a site in the human p53 gene, *Biochemistry* 33 983-991
- Perkins, B.D., Wilson, J.H., Wensel, T.G. and Vasquez, K.M.**, 1998, Triplex Targets in the Human Rhodopsin Gene, *Biochemistry* 37(32) 11315-11322
- Puchta, H., Dujon, B. and Hohn, B.**, 1993, Homologous recombination in plant cells is engaged by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease, *Nucleic Acids. Res.* 21(22) 5043-5040
- Puchta, H., Dujon, B. and Hohn, B.**, 1996, Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination, *PNAS* 93 5055-5060
- Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B. and Maas, C.**, 1996, Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 5888-5893
- Saalbach, G., Rosso, M. and Schumann, U.**, 1996, The vacuolar targeting signal of the 2S-albumin from *Bertholletia excelsa* resides at the C-terminal propeptid as an essential element, *Plant Physiol.* 112 975-985
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A.**, 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239 487-491

- Sambrook, J., Fritsch, E.P. and Maniatis, T.**, 1989, Molecular Cloning (Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Vol. 1-3
- Sauer, H., Wild, A. and Rühle, W.**, 1987, The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis. II. The causes of inhibition of photosynthesis, *Z. Naturforsch.* 42c 270-287
- Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R. and Haseloff, J.**, 1996, Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein, *Curr. Biol.* 6(12) 1653-1663
- Skuzeski, J.M., Nichols, L.M. and Gesteland, R.F.**, 1990, Analysis of leaky viral translation termination codons in vivo by transient expression of improved  $\beta$ -glucuronidase vectors, *Plant Mol. Biol.* 15 65-79
- Tachibana, K., Watanaba, T., Seikizawa, Y. and Takematsu, T.**, 1986, Accumulation of Ammonia in plants treated with bialaphos, *J. Pestic. Science* 11 33-37
- Thoung, N.T. and Helene, C.**, 1993, Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides, *Angew. Chem. Ed. Engl.* 32 666-690
- Thykjaer, T., Finnemann, J. Schauser, L. Christensen, L. Poulsen, C. and Stougard, J.**, 1997, Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking regions, *Plant Mol. Biol.* 35(4) 523-530
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. and Steinbiss, H.H.**, 1987, A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions., *Nucleic Acids Res.* 14 5890
- Valle, R.P.C., Drugeon, G., Devignes-Morch, M.D., Legocki, A.B. and Haenni, A.L.**, 1992, Codon context effect in virus translational readthrough, A study in vitro of the determinants of TMV and Mo-MuLV amber suppression, *FEBS* 306 133-139
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holster, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, J., Schilperoort, R.A. and Schell, J.**, 1974, Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability, *Nature* 252 169-170
- Tran, N.D., Liu, X., Yan, Z., Abbote, D., Jiang, Q., Kmiec, E.B., Sigmund, C.D. and Engelhardt, J.F.**, 2003, Efficiency of ChimeraPlast Gene Targeting by Direct Nuclear Injection Using a GFP Recovery Assay, *Molecular Therapy* 7(2) 248-253
- Vasquez, M.K., Narayana, L. and Glazer, P.M.**, 2000, Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice, *Science*, 290(5491) 530-533
- Vasquez, K.M., Marburger, K., Intody, Z. and Wilson, J.H.**, 2001, Manipulating the mammalian genome by homologous recombination, *PNAS* 98 8402-8410
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C.**, 1953, Molecular structure of nucleic acids, *Nature* 171 737-738
- Westin, L., Blomquist, P., Milligan, J.F. and Wrangé, O.**, 1995, Triple helix DNA alters nucleosome histone-DNA interactions and acts as a nucleosome barrier, *Nucleic Acids Research* 23 (12) 2184-2191
- Xodo, L.E., Alunni-Fabroni, M., Manzini, G. and Quadrifoglio, F.**, 1993, Sequence-specific DNA-triplex formation at imperfect homopurine-homopyrimidine sequences within a DNA plasmid, *Eur. J. Biochem.* 212 395-401
- Zhao, J., Morozova, N., Williams, L., Libs, L., Avivi, Y. and Grafi, G.**, 2001, Two Phases of Chromatin Decondensation during Dedifferentiation of Plant Cells, *The Journal of Biol. Chem.* 276(25) 22772-22778
- Zhu, T. Peterson, D.J., Tagliani, L., Clair, G.St., Baszczyński, C.L. and Bowen, B.**, 1999, Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides, *PNAS* 96 8768-8773
- Zhu, T. Mettenberg, K., Peterson, D.J., Tagliani, L. and Baszczyński**, 2000, Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides, *Nature Biotech.* 18 555-558







## **Danksagung**

Für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Braunschweig anzufertigen, danke ich Herrn Prof. Dr. G. Deml als Institutsleiter.

Besonders bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. Joachim Schiemann für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Eckhard Tacke von der Bioplant GmbH (Ebster) für die Anregung zu diesem Projekt, die ständige fachliche Unterstützung und die Bereitstellung der Kartoffel-Linien.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. G. Jach (MPI, Köln) für die umfassende Beratung zum Thema gfp-Expression in Pflanzen und die Überlassung von Konstrukten.

Meinem Mentor Herrn Prof. Dr. R. Hehl von der TU Braunschweig danke ich für die Betreuung in den universitären Angelegenheiten.

Herrn Prof. Dr. S. Dübel möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken und Herrn Prof. Dr. D. Selmar für die Bereitschaft, als zusätzlicher Prüfer in der Disputation zur Verfügung zu stehen.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Anregungen und Diskussionen möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Schiemann bedanken, insbesondere bei Anke Brißke-Rode, Katrin Schulze, Donata Isensee und Gerhild Jüttner, die mir im Labor mit Rat und Tat beiseite standen.

Allen Mitarbeitern des Institutes PS danke ich für die stets freundlich gewährte Hilfe.

Finanziert wurde das Projekt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des Verbundvorhabens „Gezielte Übertragung minimierter Transgensequenzen mit optimierter Funktion“.





## Lebenslauf

Name:	Marco Swenty
Geburtsdatum:	10.11.1969
Geburtsort:	Potsdam
Familienstand:	verheiratet, zwei Kinder
1976-1986	Polytechnische Allgemeinbildende Oberschule in Brandenburg/Havel
1986-1988	Ausbildung zum Technischen Assistenten für Meteorologie, Meteorologischer Dienst, Potsdam
1988-1990/ 1991-1992	Mitarbeiter Meteorologischer Dienst/Wetterdienst, Potsdam
1990 1991	Wehrersatzdienst, Potsdam
1989-1991	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife, VHS Potsdam
1992-1998	Studium der Biologie an der TU Braunschweig Diplomarbeit am Botanischen Institut, Thema: „Charakterisierung der Pappel ( <i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i> ) hinsichtlich ihrer Nitratreduktase- Aktivität sowie organspezifische Modulierung der Nitratreduktase- Expression durch Verwendung von <i>antisense</i> -Konstrukten“
1999-2001	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig
2001-2004	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter beratender Anleitung von Dr. J. Schiemann